



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

TEILERIOSE EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO RIBATEJO

Joana Inês Manhoso Fernandes

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Dr. Luís Alberto dos Santos Fragoso da Silva

ORIENTADOR

Dr. Luís Alberto dos Santos Fragoso
da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

TEILERIOSE EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO RIBATEJO

Joana Inês Manhoso Fernandes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Dr. Luís Alberto dos Santos Fragoso da Silva

ORIENTADOR

Dr. Luís Alberto dos Santos Fragoso
da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

2010

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Luís Fragoso, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo dos seis meses em que tive o prazer de o acompanhar. Pela amizade, simpatia e disponibilidade com que sempre me recebeu. Por todo o apoio e incentivo, e por me ter proporcionado um estágio espectacular, o meu muito obrigado! À restante equipa da Luso-Pecus, por me terem recebido tão bem. Agradeço igualmente à Eng^a Vanda, à Carla, à Cândida e à Ana, do ADS do Baixo Tejo e um agradecimento especial ao Paulo, por toda a paciência e por tudo o que aprendi com ele durante o meu estágio. Aqui fica também o meu obrigado a todos os produtores que sempre me receberam de forma tão genuína e carinhosa!

À Professora Doutora Isabel Fonseca, por toda a ajuda fundamental na elaboração desta dissertação. Pelos conhecimentos transmitidos, pela simpatia, pela disponibilidade e pela dedicação, muito obrigada! Ao “pessoal” do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, nomeadamente ao Dr. David e à Dra. Lídia, pelo apoio que me deram e pela boa-disposição! A todos os Professores da FMV, que muito contribuíram para eu chegar a esta etapa final! Agradeço ao Dr. João Monteiro, o primeiro Veterinário que conheci!

A todos os meus colegas da FMV, que se tornaram verdadeiros amigos, desde os que conheci no primeiro dia até às amizades que se construíram nos últimos tempos. À Marta Reis, à Joana Viera, à Juliana, à Catarina Silva, à Márcia, aos “Gémeos”, ao Zé, ao Hélio, à Inês e a todos os que não referi, mas que sabem ser igualmente importantes! Sem vocês estes anos, não teriam sido a mesma coisa! À Joana Ramos, pela amizade e por toda a ajuda na formatação desta dissertação. Agradeço aos meus amigos de sempre, que acreditaram em mim e sempre estiveram do meu lado! À Vânia, à Nicole, ao Filipe Manel, ao Filipe Miguel, à Cátia, ao Nuno, à Carla e à Ana N., à Bina e à Ana, um obrigado especial! Ao Ricardo, que me ajudou a chegar até aqui e que sempre me apoiou, muito obrigado!

Por último, mas como os últimos são sempre os primeiros...

À minha mãe, a lutadora, pois sem ela nenhum dos meus sonhos se teria tornado realidade! À minha avó, que me ensinou tudo, que me deu tudo e continua sempre presente! És e serás sempre a minha estrelinha! Ao meu avô que também sempre me apoio e me viu crescer! Ao João Vitor, o mano que não era esperado, mas é mais que desejado, pelo “caos” que gera, pelo sorriso que me rouba e por estar sempre comigo! Ao meu pai, que consegue que os momentos de presença, superem os de ausência e que me ajudou em todas as etapas! À minha tia Angélica, minha avó, por estar sempre presente na minha vida! À minha Madrinha, que é o meu exemplo de força e coragem e que tem sempre a palavra certa, no momento certo! Ao Avô Joaquim, sempre amigo e presente, e à Avó Lucília, por sempre me apoiarem! Ao Bruno, um muito obrigado, por me apoiar nesta fase tão importante e por toda a ajuda e paciência nos dias mais complicados!

À Sasha, minha fiel amiga das longas noites! Ao Farrusco, à Nina e à Lady!

TEILERIOSE EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO RIBATEJO

RESUMO

A Teileriose é uma doença parasitária causada por *Theileria* spp., transmitida por vectores da família IXODIDAE. Esta hemoparasitose representa uma ameaça à produção de bovinos, em diferentes países, conduzindo a elevadas perdas económicas. São conhecidas várias espécies de *Theileria*, sendo as mais patogénicas *Theileria annulata*, agente da Teileriose Tropical ou Mediterrânica, e *Theileria parva*, agente da Febre da Costa Oriental.

Em Portugal, o Ribatejo e o Alentejo são consideradas regiões endémicas de Teileriose Mediterrânica, devido à elevada ocorrência de ixodídeos do género *Hyalomma*. Os objectivos deste estudo foram: (i) avaliar a presença de *Theileria* spp. em 112 bovinos de aptidão carne de uma exploração da região do Ribatejo; (ii) estabelecer níveis de infecção para os géneros de hemoparasitas encontrados e (iii) identificar uma amostra de ixodídeos, recolhidos da população em estudo. Através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos, detectou-se que a prevalência de *Theileria* spp. foi de 100%. O género *Anaplasma* também foi identificado em todos os bovinos estudados. Relativamente aos níveis de infecção de *Theileria* spp., concluiu-se que o nível I (1-10 merozoítos/10 campos) foi o mais prevalente, tanto nos bovinos reprodutores, com 87,5% (84/96), como nos vitelos, com 37,5% (6/16) dos animais infectados. Estes dados sugerem que a maioria dos animais apresentava infecção subclínica, constituindo um grupo de portadores assintomáticos. Os níveis de infecção II (11-20 merozoítos/10 campos) e III (> 20 merozoítos/10 campos) tiveram uma maior expressão nos vitelos, com 31,3% (5/16) em cada nível, do que nos animais adultos, em que 12,5% (12/96) estavam infectados em nível II e nenhum animal se encontrava infectado em nível III. Os níveis de infecção mais elevados nos vitelos estão de acordo com a maior susceptibilidade destes animais a *Theileria* spp.. Quanto a *Anaplasma* spp., o nível de infecção I foi o mais frequente, tanto nos animais reprodutores (60,4%), como vitelos (50%). Dos 92 ixodídeos identificados, 65% (60/92) pertenciam ao género *Hyalomma* e 35% (32/92) eram *Rhipicephalus* spp., reconhecidos como vectores de *Theileria* spp..

Os dados obtidos neste estudo realçam a importância da Teileriose em Portugal. Desta forma, conclui-se ser necessária uma maior investigação acerca da epidemiologia e patogenia da doença.

Palavras-chave: bovinos de carne, *Theileria* spp., *Anaplasma* spp., prevalência, níveis de infecção, *Hyalomma* spp.

THEILERIOSIS IN BEEF CATTLE IN THE RIBATEJO REGION

ABSTRACT

Theileriosis is a tick-borne disease caused by *Theileria* spp. protozoa and transmitted by vectors from IXODIDAE family. This parasitic disease constitutes a threat to cattle production in different countries, leading to economic losses. There are various species of *Theileria*, being *T. annulata*, the most pathogenic agent in Tropical or Mediterranean Theileriosis, and *T. parva*, the agent of East Coast Fever.

In Portugal, Ribatejo and Alentejo regions are considered endemic for Mediterranean Theileriosis due to the high incidence of ticks of the genus *Hyalomma*. The aims of this study were: (i) to evaluate the presence of *Theileria* spp. in 112 beef cattle from a farm located in endemic region of Ribatejo; (ii) to establish blood infection levels and (iii) to identify the genus of the ticks collected in the studied population. Microscopic blood smears observation, showed that *Theileria* spp. prevalence was 100% either in adults and in calves. The genus *Anaplasma* was also identified in all the studied animals. Concerning *Theileria* spp. levels of infection, level I (1-10 merozoites/10 fields) was the most prevalent, both in adult cattle and calves, with 87,5% (84/86) and 37,5% (6/16) respectively. These data suggest that most of the animals had subclinical infection, constituting a group of asymptomatic carriers. Infection levels II (11-20 merozoites/10 fields) and III (> 20 merozoites/10 fields) had a higher expression in calves with 31,3% (5/16) in both, than in adult animals, in which 12,5% (12/96) were infected at level II and no adult animal was infected in level III. The infection levels are highest in calves since these animals are more susceptible to *Theileria* spp. infection. In relation to *Anaplasma* spp. infection, level I was the most frequent, in both breeding animals (60,4%) and calves (50%). Of the 92 ticks identified, belonged to the genus *Hyalomma*, 65% (60/96) and to *Rhipicephalus* 35% (32/96) recognized as vectors of *Theileria* spp..

Data obtained in this study emphasizes the importance of theileriosis in Portugal. In this way, further investigation on spreading and pathogenesis of theileriosis is needed.

Key-words: Beef cattle, *Theileria* spp., *Anaplasma* spp., prevalence, levels of infection, *Hyalomma* spp.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
 I. INTRODUÇÃO.....	 1
1. Descrição de actividades desenvolvidas durante o estágio	2
1.1. Actividades realizadas no âmbito da Sanidade Animal.....	2
1.2. Actividade Clínica	6
1.2.1. Casuística da actividade clínica.....	7
 II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE TEILERIOSE BOVINA	 10
1. Etiologia, classificação taxonómica e biologia.....	10
1.1. Hospedeiros vertebrados.....	11
1.2. Ciclo de vida de <i>Theileria</i> spp.....	11
1.3. Vectores de <i>Theileria</i> spp.....	13
2. Epidemiologia	14
2.1. Transmissão	15
2.2. Distribuição geográfica	16
2.3. Teileriose em Portugal.....	17
2.4. Factores de risco	20
3. Patogenia	21
4. Imunidade.....	23
4.1. Susceptibilidade à infecção	25
5. Sinais clínicos	26
6. Alterações laboratoriais	28
7. Lesões <i>post-mortem</i>	32
8. Diagnóstico.....	33
8.1. Diagnóstico microscópico	33
8.2. Diagnóstico serológico	34
8.2.1. Testes de IFA.....	35
8.2.2. Testes de ELISA	36
8.3. Diagnóstico molecular	37
8.3.1. Reação em cadeia de polimerase (“Polymerase chain reaction”, PCR).....	37
8.3.2. “Reverse line blot” (RLB).....	38

8.4. Diagnósticos diferenciais	40
8.4.1. Anaplasmosse	40
8.4.2. Babesiose	41
8.4.3. Tripanossomose.....	42
8.4.4. Febre Catarral Maligna.....	42
8.4.5. Septicémia Hemorrágica	43
8.4.6. Peripneumonia contagiosa bovina.....	43
8.4.7. Leucose Bovina.....	44
8.4.8. “Heartwater” (Erlíquiose, ex-Cowdriose)	45
8.4.9. Febre do Vale do Rift	45
9. Prognóstico.....	46
10. Tratamento	46
11. Controlo.....	49
 III. TEILERIOSE EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO RIBATEJO	52
1. Introdução	52
2. Objectivos.....	55
3. Materiais e Métodos	55
3.1. Localização da exploração	55
3.1.1. Caracterização edafo-climática da região.....	55
3.2. Caracterização da população estudada.....	57
3.2.1. Amostragem.....	58
3.3. Colheita e conservação de amostras.....	59
3.4. Processamento das amostras	60
3.4.1. Execução, coloração e observação dos esfregaços sanguíneos	60
3.4.2. Identificação dos ixodídeos	61
3.5. Métodos estatísticos	61
4. Resultados	62
4.1. Esfregaços Sanguíneos.....	62
4.2. Ixodídeos.....	73
5. Discussão.....	75
6. Conclusão	89
BIBLIOGRAFIA.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Área geográfica de actuação do ADS Baixo Tejo.....	2
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Theileria</i> spp.	13
Figura 3 – <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	14
Figura 4 – <i>Hyalomma marginatum</i>	14
Figura 5 – Distribuição mundial das principais espécies de <i>Theileria</i> em bovinos.....	17
Figura 6 – Linfonodo poplíteo de bovino - Hipertrofia do linfonodo e presença de petéquias.....	32
Figura 7 – Rim de bovino com múltiplos focos pálidos, devido à infiltração linfóide.....	32
Figura 8 – Representação esquemática da técnica RLB.....	40
Figura 9 – Aspectos lesionais observados durante a necrópsia de vitelo (originais)	
a) Nódulo cutâneo	52
b) Linfonodo pré-escapular hemorrágico.....	52
c) Cavidade abdominal com lesões hemorrágicas a nível do mesentério e intestino delgado.....	53
Figura 10 – Petéquias no pavilhão auricular (a) e na mucosa oral e lingual (b) de um vitelo, numa exploração do Alentejo (imagens gentilmente cedidas por M. Centeno)	54
Figura 11 – Concelho de Benavente, localizado no Distrito de Santarém	55
Figura 12 – Freguesia de Santo Estêvão, localizada no concelho de Benavente.....	55
Figura 13 – Aspectos da exploração em estudo (a; b) (originais).....	56
Figura 14 – Vaca com edema submandibular evidente (original).....	59
Figura 15 – Diversas formas de merozoítos (setas) de <i>Theileria</i> spp. Ampliação x900 aprox. (Original)	62
Figura 16 – Exemplos de <i>Anaplasma</i> spp. (setas) Ampliação x900 aprox. (Original)	63
Figura 17 – Macho do género <i>Hyalomma</i> (face dorsal) (original).....	73
Figura 18 – Macho do género <i>Hyalomma</i> (face ventral) (original).....	73
Figura 19 – Fêmea do género <i>Hyalomma</i> (face dorsal) (original).....	73
Figura 20 – Fêmea engorgitada do género <i>Hyalomma</i> (face dorsal) (original).....	73
Figura 21 – Macho do género <i>Rhipicephalus</i> (face dorsal) (original).....	74
Figura 22 – Macho do género <i>Rhipicephalus</i> (face ventral) (original).....	74

Figura 23 – Fêmea do género <i>Rhipicephalus</i> (face dorsal) (original)	74
Figura 24 – Fêmea engorgitada do género <i>Rhipicephalus</i> (face dorsal) (original).....	74

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Evolução do número de grandes e pequenos ruminantes na área de intervenção do ADS Baixo Tejo	3
Gráfico 2 - Evolução do número de efectivos da área de intervenção do ADS Baixo Tejo	3
Gráfico 3 - Caracterização actual dos animais intervencionados pelo ADS Baixo Tejo (N=21239)	4
Gráfico 4 - Percentagem de consultas realizadas em cada espécie animal	6
Gráfico 5 - Distribuição dos níveis de infecção de <i>Theileria</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp. nos animais reprodutores (N=96)	66
Gráfico 6 - Proporção dos níveis de infecção de <i>Theileria</i> spp. nos animais reprodutores (N=96)	67
Gráfico 7 - Proporção dos níveis de infecção de <i>Anaplasma</i> spp. nos animais reprodutores (N=96)	67
Gráfico 8 - Distribuição dos níveis de infecção de <i>Theileria</i> spp. por grupos etários, nos animais reprodutores (N=96)	68
Gráfico 9 - Distribuição dos níveis de infecção de <i>Anaplasma</i> spp. por grupos etários, nos animais reprodutores (N=96)	69
Gráfico 10 - Distribuição dos níveis de infecção de <i>Theileria</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp. em vitelos (N=16)	70
Gráfico 11 - Proporção dos níveis de infecção de <i>Theileria</i> spp. nos vitelos (N=16)	70
Gráfico 12 - Proporção dos níveis de infecção de <i>Anaplasma</i> spp. nos vitelos (N=16)	71
Gráfico 13 - Distribuição dos níveis de infecção de <i>Theileria</i> spp. por grupos etários, nos vitelos (N=16)	71
Gráfico 14 - Distribuição dos níveis de infecção de <i>Anaplasma</i> spp. por grupos etários, nos vitelos (N=16)	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Casuística da actividade clínica realizada em ovinos e caprinos.....	7
Tabela 2 - Casuística da actividade clínica realizada em bovinos	8
Tabela 3 - Casuística da actividade clínica realizada em equinos.....	9
Tabela 4 - Espécies de <i>Theileria</i> , respectivos hospedeiros vertebrados e invertebrados e distribuição geográfica (Adaptado de Campillo & Vázquez (2002), <i>Parasitologia Veterinária</i> , p.295; Center for Food Security and Public Health (2009), Theileriosis, www.cfsph.iastate.edu).....	10
Tabela 5 - Idades e respectivos grupos etários, por número de animais reprodutores.....	57
Tabela 6 - Idades e respectivos grupos etários, por número de vitelos	58
Tabela 7 - Critérios para o estabelecimento dos níveis de infecção relativamente aos géneros <i>Theileria</i> e <i>Anaplasma</i>	60
Tabela 8 - Resultados da observação dos esfregaços sanguíneos dos animais reprodutores por níveis de infecção e por parasitas.....	64
Tabela 9 – Resultados da observação dos esfregaços sanguíneos dos vitelos por níveis de infecção e por parasitas	69
Tabela 10 - Distribuição do número de espécimes identificados, por género e sexo	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ADS – Agrupamento de Defesa Sanitária
AHV-1 – herpesvírus-1 alcelafino
ALT – Alanina amino transferase
AST – Aspartato amino transferase
BUN – *Blood Urea Nitrogen*
CACs – *Cytostatic acting cells*
cELISA – ELISA competitivo
CID – Coagulação intravascular disseminada
CK – creatinina-quinase
DGV – Direcção Geral de Veterinária
DIV – Direcção de Intervenção Veterinária
EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
FCM – Febre Catarral Maligna
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
GGT – Gama-glutamyl transferase
IFA – *Indirect Fluorescent Antibody*
IL – Interleucina
IL- R – Receptores da Interleucina
INF- γ – Interferão-gama
LEB – Leucose Enzoótica Bovina
LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
M.O. – Microscópio óptico
MCHC – *Mean corpuscular hemoglobin* (Concentração de hemoglobina corpuscular média)
MCV – *Mean corpuscular volume* (Volume corpuscular médio)
MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo maior de histocompatibilidade)
mRNA – *messenger Ribonucleic Acid*
NO – óxido nítrico
OHV-2 – herpesvírus-2 ovino
OPP – Organização de Produtores Pecuários
PBMCs – *Peripheral blood mononuclear cells*
PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reacção em cadeia de polimerase)
PDF – Produtos de degradação do fibrinogénio
PIM – *Polymorphic immunodominant molecule*
PPCB – Peripneumonia Contagiosa Bovina

PPD – *Purified Protein Derivated*

RBC – *Red Blood Cell*

RFLP – *restriction fragment length polymorphism*

RLB – *Reverse Line Blot*

RNA – *Ribonucleic Acid*

T CD4⁺ - Linfócitos T auxiliares

T CD8⁺ - Linfócitos T citotóxicos

TaSP- *Theileria annulata* surface protein (protína de superfície *T. annulata*)

Th – T *helper*

TNF- α – Factor de Necrose Tumoral

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

VLB – Vírus da Leucose Bovina

I. INTRODUÇÃO

O Estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Técnica de Lisboa (UTL) tem como objectivo a aplicação dos conhecimentos práticos e teóricos adquiridos ao longo de cinco anos de curso, sendo um contributo de extrema importância para a formação e desenvolvimento dos futuros Médicos Veterinários.

No presente caso, o estágio teve início a 23 de Setembro de 2009 e terminou a 23 de Março de 2010. Durante este período, a autora acompanhou a intervenção do Dr. Luís Fragoso nas actividades que desenvolveu como Médico Veterinário Coordenador e Executor do Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) de Gado Bovino, Ovino e Caprino do Baixo Tejo e na clínica de espécies pecuárias, trabalho desenvolvido no âmbito da equipa clínica liderada também pelo Dr. Luís Fragoso e integrante na empresa de prestações de serviços designada por Luso-Pecus,Lda.

A presente dissertação de Mestrado inicia-se com uma breve descrição do trabalho efectuado pelo ADS/OPP (Organização de Produtores Pecuários) do Baixo Tejo, seguida pela apresentação das actividades desenvolvidas durante o Estágio, incluindo a casuística.

Por último, será desenvolvido o tema específico deste trabalho, “Teileriose em Bovinos de Carne na Região do Ribatejo”.

A observação de um quadro clínico “atípico”, com confirmação laboratorial de casos de Teileriose em alguns bezerros numa exploração do Ribatejo, durante o período de estágio e o facto de esta ser considerada uma zona endémica no que diz respeito às hemoparasitoses, foram as principais razões que levaram à escolha deste tema. Por outro lado, os hemoparasitas podem ser os principais responsáveis ou contribuir, para quebras nos índices produtivos de um efectivo e, muitas vezes, as medidas de controlo dos seus vectores são negligenciadas.

Este trabalho é o culminar dos conhecimentos adquiridos e vivências partilhadas na FMV, de toda a aprendizagem ao longo do período de estágio e do trabalho desenvolvido nestes últimos meses no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV, UTL.

1. Descrição de actividades desenvolvidas durante o estágio

As actividades realizadas durante o estágio encontram-se divididas em Sanidade de pequenos e grandes ruminantes, por um lado, e Clínica, Cirurgia e Reprodução das espécies pecuárias, por outro.

1.1. Actividades realizadas no âmbito da Sanidade Animal

O ADS Baixo Tejo foi fundado no último trimestre de 1988, com publicação no Diário da República nº 231, 3ª série, de 6 de Outubro desse ano, tendo iniciado funções em Janeiro do ano seguinte. O objectivo principal seria o de melhorar e manter o estatuto sanitário das explorações de grandes e pequenos ruminantes entretanto associadas, levando no final a uma melhoria dos índices produtivos, enquadrado na Portaria 63/86 de 1 de Março. Hoje em dia, engloba o concelho de Benavente com as freguesias de Benavente, Samora Correia, Barrosa e Santo Estêvão e, tem também associados nas freguesias de Vila Franca de Xira, Vila Nova da Rainha e Azambuja. Com a publicação da Portaria nº 178/2007, de 9 de Fevereiro, esta área pode ser alargada a todas as explorações que pertencem à mesma Direcção de Intervenção Veterinária (DIV), neste caso a DIV do Ribatejo (ADS Baixo Tejo, 2009).

Figura 1 – Área geográfica de actuação do ADS Baixo Tejo



Nos gráficos 1 e 2, pode observar-se que o número de bovinos, pertencentes à área de intervenção deste ADS, aumentou em relação ao ano de 1997 (gráfico 1), contudo o número de efectivos desta espécie diminuiu desde esse ano (gráfico 2). Quanto aos pequenos ruminantes, ocorreu a situação inversa, pois o número de efectivos aumentou, atingindo o valor máximo em 2006 (gráfico 2).

Gráfico 1- Evolução do número de grandes e pequenos ruminantes na área de intervenção do ADS

Baixo Tejo

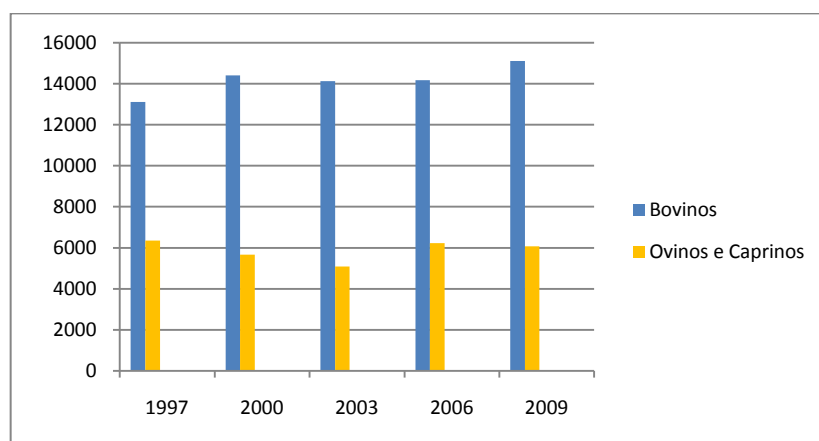
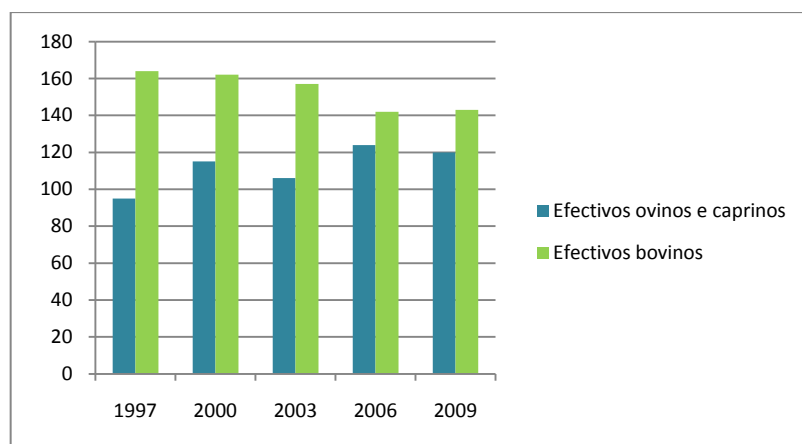
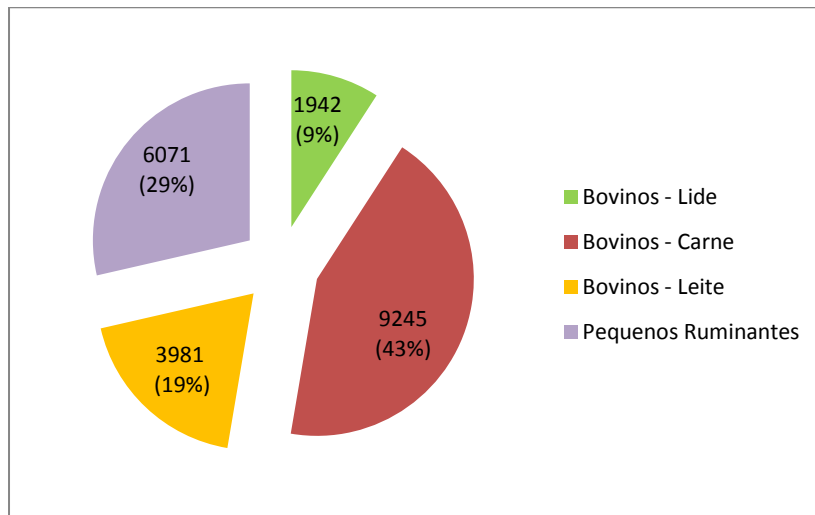


Gráfico 2 - Evolução do número de efectivos da área de intervenção do ADS Baixo Tejo



Em 2009, o número total de animais, sob controlo sanitário deste ADS e com acções de profilaxia sanitária executadas, foi de 15113 bovinos e 6071 ovinos e caprinos, sendo que o número de efectivos foi de 143 e 120, respectivamente. A estes totais devem acrescentar-se os ruminantes sob vigilância epidemiológica e co-habitantes, bem como as explorações de engorda que recorrem a serviços veterinários prestados pelo departamento técnico do ADS e que prefazem um total de 25798 bovinos.

Gráfico 3 - Caracterização actual dos animais intervencionados pelo ADS Baixo Tejo (N=21239)



Durante o período de estágio, a autora teve oportunidade de acompanhar e participar em acções desenvolvidas pela Brigada nº 1 do ADS Baixo Tejo, acções essas que se centraram nas seguintes actividades:

- Execução dos programas dos Planos de Erradicação Nacional de Saúde Animal anualmente protocolados com o Estado;
- Detecção, análise e resposta imediata ao aparecimento de novas doenças, estabelecendo programas de controlo e combate individual ou colectivo no universo das explorações controladas;
- Prestação de serviços administrativos e de apoio técnico a toda a actividade laboral do sector da saúde animal das explorações e pecuária dos seus associados.

No âmbito dos Programas sanitários desenvolvidos por este ADS e no seguimento dos Planos de Erradicação e Vigilância da Tuberculose Bovina, da Brucelose Bovina e de pequenos ruminantes, da Leucose Enzoótica Bovina e da Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) são efectuadas as seguintes acções:

- Identificação animal, através da aposição de marcas auriculares oficiais, realizada segundo o estipulado pelos serviços sanitários oficiais;
- Provas de intradermotuberculinização comparada, com Derivado de Proteína Tuberculina Purificada (Purified Protein Derivated, PPD) aviária e mamífera, realizada à totalidade de fêmeas dos efectivos bovinos com idade superior a 6 semanas e aos machos com idade superior a 12 meses; a leitura da prova é efectuada 72 horas após a sua execução (ao abrigo do DL nº 272/2000 de 8 de Novembro);
- Colheita de amostras de sangue a ovinos, caprinos e bovinos. Esta colheita de sangue no caso dos pequenos ruminantes tem em conta a execução do programa de erradicação da Brucelose (Decreto-Lei nº 244/2000 de 27 de Setembro). Nos

bovinos, esta intervenção realiza-se no âmbito da execução dos programas de erradicação da Brucelose Bovina (Decreto-Lei nº 244/2000 de 27 de Setembro) e da Leucose Enzoótica Bovina (Decreto-Lei nº 114/99) e do plano de Vigilância da Peripneumonia Contagiosa dos Bovinos (Decreto-Lei nº 179/98).

É também cumprido o programa oficial de vacinação de ovinos contra o serótipo 1 da Língua Azul e identificação com marca auricular específica do modelo oficial (Edital nº 24);

No âmbito da Profilaxia Médica, e como programa básico a oferecer a todas as explorações, são ainda seguidos:

- Programas de Vacinação:
 - vacinação bi-anual de pequenos ruminantes contra a Enterotoxémia e as Pasteureloses;
 - vacinação anual de bovinos contra as Clostridioses;
- Programas de Desparasitação:
 - desparasitação sistémica nos bovinos com ivermectina a 1% associada ao clorsulon na concentração de 10%.
 - desparasitação oral nos pequenos ruminantes com mebendazol e closantel.

A acrescentar a estas acções sanitárias, o ADS elabora e executa outros programas de controlo a diferentes morbos, no sentido de obter sempre os melhores índices produtivos para cada uma das explorações associadas.

No que respeita à higiene pecuária, o ADS informa e aconselha no planeamento de acções de desinfecção, desinsectização e desratização.

Em explorações produtoras de leite, é prestado todo o apoio na elaboração de programas de controlo das mamites, na escolha do melhor produto de secagem, na detecção de agentes causadores de mamites e gestão de antibióticos.

Nos últimos seis anos, os bovinos sujeitos a saneamento pelo ADS Baixo Tejo não apresentaram resultados positivos no que diz respeito às quatro doenças contempladas nos Planos de Erradicação e Vigilância. Situação idêntica, foi registada nos últimos quatro anos, no caso da Brucelose em Pequenos Ruminantes.

Contudo, junto desta equipa e segundo a perspectiva do Médico-Veterinário Coordenador e Executor deste ADS, Dr. Luís Fragoso, foi possível compreender que as medidas levadas a cabo por um organismo desta natureza não se devem limitar à execução dos planos de erradicação e medidas anualmente protocolados com o Estado. O Médico-Veterinário tem o dever de alertar os produtores, para outras doenças que levam a diminuições de índices

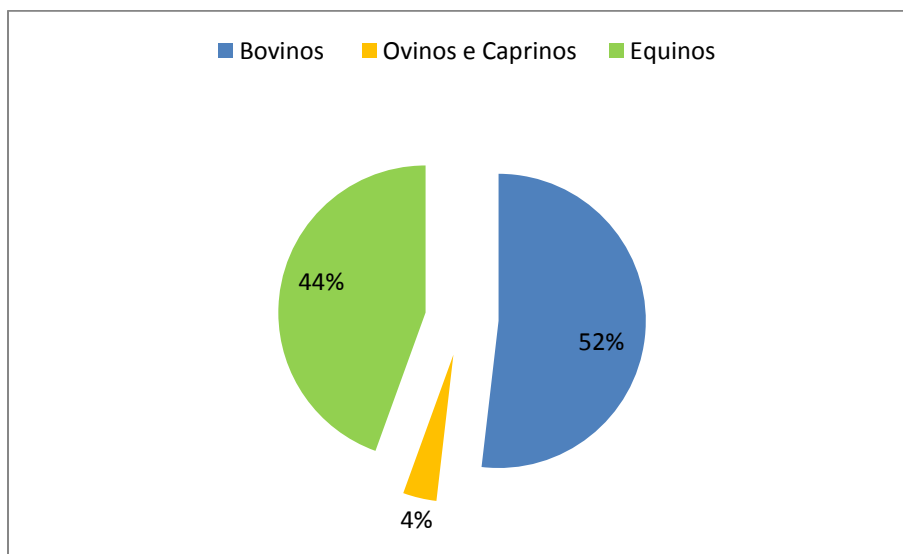
produtivos e reprodutivos e, junto de cada produtor, debater questões relacionadas com a nutrição, manejo e reprodução dos efectivos, encontrando as soluções mais adaptadas a cada exploração.

1.2. Actividade Clínica

O acompanhamento diário do Dr. Luís Fragoso no trabalho desenvolvido na Luso-Pecus, Lda. ao longo dos seis meses de estágio, possibilitou a observação e participação na resolução de diversos casos clínicos em diferentes áreas tais como a Clínica, a Cirurgia e a Reprodução das grandes espécies. As espécies pecuárias alvo de consultas foram a bovina, a equina, a ovina e a caprina.

Num total de 542 casos observados, a espécie bovina foi a espécie alvo da maioria das consultas, com 281 casos registados, seguida dos equinos com 241 casos clínicos. A clínica dos pequenos ruminantes teve menor expressão durante o período de estágio, com apenas 20 casos registados. O gráfico 4, permite observar a percentagem de consultas nas diferentes espécies referidas.

Gráfico 4 - Percentagem de consultas realizadas em cada espécie animal



1.2.1. Casuística da actividade clínica

De seguida, são apresentados os diferentes casos clínicos, ocorridos durante o período de estágio. Para facilitar a consulta e para a descrição não se tornar demasiado extensa, estes são agrupados em três tabelas distintas (Tabela 1, 2 e 3, consoante se tratem de casos ocorridos nas espécies ovina/caprina, bovina e equina, respectivamente) e organizados conforme o Aparelho/Sistema/Tecido afectado, a doença ocorrida ou a intervenção realizada.

Tabela 1 - Casuística da actividade clínica realidade em ovinos e caprinos

	Nº casos
Aparelho Digestivo	1
Enterite	1
Aparelho Músculo-esquelético e locomotor	3
Claudicação	1
Feridas suturadas	2
Aparelho Reprodutor	8
Partos	3
Distócicos	3
Endometrite	2
Outros	8
Cegueira	1
Anemia	3
Hipocalcémia	1
Eutanásia	2
Necrópsia	1
TOTAL	20

Tabela 2 - Casuística da actividade clínica realizada em bovinos

	Nº casos
Aparelho Digestivo	10
Timpanismo Gasoso	4
Enterite	1
Diarreia	1
Úlcera do Abomaso	1
Deslocamento do Abomaso (suspeitas)	2
Hérnia umbilical	1
Aparelho Respiratório	14
Complexo Respiratório Bovino	14
Aparelho Músculo-esquelético e locomotor	6
Claudicação	6
Pele e tecido subcutâneo	30
Abcessos	6
Limpeza e desinfecção de feridas	24
Sistema Nervoso	1
Meningite	1
Aparelho Reprodutor	205
Diagnóstico de Gestação	160
Partos	7
Eutócicos	2
Distócicos	3
Cesareanas	2
Prolapso Vaginal	1
Prolapso Uterino	3
Endometrite	2
Retenção Placentária	1
Síndrome da vaca caída	6
Castração	15
Remoção de abcesso prepucial	1
Recolha de sêmen	2
Outros	15
Doenças parasitárias e bacterianas	5
Teileriose	3
Leptospirose	2
Eutanásia	2
Necrópsia	3
TOTAL	281

Tabela 3 - Casuística da actividade clínica realizada em equinos

	Nº casos
Aparelho Digestivo	2
Cólica	2
Aparelho Respiratório	4
Rinotraqueíte infecciosa	3
Doença pulmonar obstrutiva crónica	1
Aparelho Músculo-esquelético e locomotor	14
Claudicação	11
Feridas suturadas	3
Pele e tecido subcutâneo	18
Excisão de tumor	1
Alopécia	2
Feridas suturadas	3
Limpeza e desinfeção de feridas	12
Sistema Nervoso	1
Intoxicação	1
Aparelho Reprodutor	52
Diagnóstico de gestação	48
Retenção Placentária	1
Aborto	1
Castração	1
Excisão de tumor prepucial	1
Outras intervenções	150
Resenho gráfico	31
Identificação com aplicação de microchip	27
Recolha de sangue para hemótipo	27
Vacinação	15
Desparasitação	30
Administração parenteral de vitaminas	20
TOTAL	241

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE TEILERIOSE BOVINA

1. Etiologia, classificação taxonómica e biologia de *Theileria* spp.

A Teileriose é uma doença provocada por parasitas pertencentes ao Reino PROTISTA, SubReino PROTOZOA, Filo APICOMPLEXA, Classe ESPOROZOA, Ordem PIROPLASMIDA, Família THEILERIIDAE, género *Theileria* (Levine *et al.*, 1980, citado por Branco, 2009).

Estes parasitas são protozoários intracelulares obrigatórios dos eritrócitos.

São conhecidas várias espécies de *Theileria* que infectam os bovinos (Tabela 4), sendo *Theileria annulata* (*T. annulata*) e *Theileria parva* (*T. parva*) as mais patogénicas e de maior impacto económico (Navarrete, Serrano & Reina, 2002; Center for Food Security and Public Health [CFSPH], 2009).

Tabela 4 - Espécies de *Theileria*, respectivos hospedeiros vertebrados e invertebrados e distribuição geográfica (Adaptado de Campillo & Vázquez (2002), *Parasitologia Veterinária*, p.295; Center for Food Security and Public Health (2009), Theileriosis, www.cfsph.iastate.edu)

Parasita	Hospedeiro Vertebrado	Hospedeiro Invertebrado	Distribuição geográfica
<i>T. annulata</i>	<i>Bos taurus</i> <i>Bubalus bubalis</i> <i>Syncerus caffer</i> <i>Bos grunniens</i>	<i>Hyalomma</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp.	Norte de África, Sul da Europa, Médio Oriente, Índia
<i>T. parva</i>	<i>Bos taurus</i> <i>Syncerus caffer</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	África Central e Oriental
<i>T. buffeli</i> <i>T. orientalis</i> <i>T. sergenti</i>	<i>Bos taurus</i> <i>Syncerus caffer</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp.	Cosmopolita
<i>T. mutans</i>	<i>Bos taurus</i> <i>Syncerus caffer</i>	<i>Amblyomma</i> spp.	África subsahariana
<i>T. velifera</i>	<i>Bos taurus</i> <i>Syncerus caffer</i>	<i>Amblyomma</i> spp.	África
<i>T. taurotragi</i>	<i>Bos taurus</i> <i>Taurotragus oryx</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	África

As espécies *T. mutans* e *T. taurotragi*, normalmente, não causam doença, mas podem provocar uma infecção moderada, sendo considerados os agentes da Teileriose africana benigna. Por sua vez, *T. velifera* e *T. buffeli* são consideradas espécies não patogénicas (García-Sanmartín, Nagore, García-Pérez, Juste & Hurtado, 2006). Contudo, foi descrito um caso clínico associado a infecção por *T. buffeli* (Stockam *et al.*, 2000). Pensa-se, actualmente, que o grupo de parasitas a que se refere o complexo *T. sergenti* / *T. buffeli* / *T.*

orientalis, é, na verdade, constituído por duas espécies, *T. sergenti*, presente na Ásia e *T. buffeli*/*T. orientalis* (sinónimos para o mesmo parasita), com uma distribuição geográfica global (Fujisaki, Kawasu & Kamio, 1994, citado por Office International des Épizooties [OIE], 2008).

1.1. Hospedeiros vertebrados

As espécies de *Theileria* spp. podem infectar ruminantes domésticos e selvagens. Em África, têm sido encontradas na maioria dos animais da Família BOVIDAE e, nos outros continentes, também têm sido reportados casos em animais selvagens.

A espécie *T. parva* pode infectar o bovino doméstico, o búfalo africano (*Syncerus caffer*), o búfalo de água (*Bubalus bubalis*) e um antílope encontrado no continente africano (*Kobus* spp.). As infecções clínicas só ocorrem normalmente no bovino e no búfalo de água. A espécie *T. annulata* infecta bovinos, iaques (*Bos grunniens*), búfalos de água e camelos. Para além de infectar bovinos, a espécie *T. taurotragi* tem sido encontrada no elande (*Taurotragus oryx*) (CFSPH, 2009).

1.2. Ciclo de vida de *Theileria* spp.

O ciclo de vida de *Theileria* spp segue o modelo característico dos géneros que pertencem ao Filo APICOMPLEXA. Trata-se, pois, de um ciclo com reprodução alternada, pelo que no vector, o ixodídeo, ocorre reprodução sexuada (gametogonia) e assexuada (esporogonia), enquanto que no hospedeiro vertebrado, o bovino, ocorre apenas reprodução assexuada – merogonia ou esquizogonia (Navarrete *et al.*, 2002).

Os bovinos infectam-se quando a forma de esporozoítos do parasita é inoculada através da saliva de um ixodídeo infectado, aproximadamente três a cinco dias após o início do processo de alimentação deste no hospedeiro definitivo. Contudo, se as condições ambientais assim o permitirem, os esporozoítos podem desenvolver-se quando o ixodídeo ainda se encontra no solo e infectar o hospedeiro vertebrado em apenas algumas horas (Navarrete *et al.*, 2002). A fase de esquizogonia tem início quando os esporozoítos são inoculados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva da carraça vector infectada (transmissão do tipo transtadial, efectuada pela ninfa e adulto) durante o processo de alimentação (Ahmed, Rehbein & Schein, 1984, citado por Ahmed, Glass, Salih & Seitzer, 2008; Spooner, Innes, Glass & Brown, 1989).

Os esporozoítos penetram rapidamente nas células-alvo, crescem no interior de um vacúolo que desaparece nas 24 horas pós-infecção, deixando o parasita livre no citoplasma da célula hospedeira (Tilney & Tilney, 1996, citado por Ahmed *et al.*, 2008). Esta fase do ciclo é a responsável pela patogenia desta infecção (McKeever, 2009).

Os esporozoítos de *T. annulata* infectam as células mononucleares do hospedeiro (macrófagos, monócitos e linfócitos B) dos linfonodos regionais próximos do ponto de fixação e de inoculação do ixodídeo. Os esporozoítos iniciam uma primeira fase de reprodução assexuada, nas células mononucleares do hospedeiro vertebrado, originando os macroesquizontes. A presença de *Theileria* spp. nas células mononucleares do hospedeiro induz a sua proliferação descontrolada e, conseqüentemente, a dos parasitas (Navarrete *et al.*, 2002 & Graham *et al.*, 2001). O aumento de leucócitos parasitados ocorre tão rapidamente que, em apenas três dias, o número de células parasitadas é dez vezes maior que inicialmente (Navarrete *et al.*, 2002). Após a replicação dos macroesquizontes, tem início a formação dos microesquizontes, no interior das mesmas células. Os esquizontes, também designados por “corpos azuis de Koch”, medem, aproximadamente, 2 a 12 µm de diâmetro, são multinucleados, com citoplasma basófilo e grânulos eosinófilos de cromatina de 0,3 µm nos microesquizontes e 0,8 µm nos macroesquizontes (Navarrete *et al.*, 2002).

Os esquizontes diferenciam-se em merozoítos, que são libertados após lise da célula infectada e invadem os eritrócitos oito a dez dias pós-infecção, no caso de *T. annulata* e 12 a 14 dias, na infecção por *T. parva* (Mehlhorn & Schein, 1984). De seguida, ocorre o desenvolvimento de piroplasmas intra-eritrocitários, infectantes para o vector (Campbell, 1999; Forsyth, 1999, citados por Ramazan *et al.*, 2007). Estes reproduzem-se assexuadamente, por divisão binária ou bipartição, dando lugar à replicação de novos merozoítos que infectam outros eritrócitos (Navarrete *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2008).

Os bovinos que recuperam da infecção normalmente tornam-se portadores destas formas, mas a duração do estado de portador varia conforme a estirpe infectante e depende da persistência de um pequeno número de células infectadas por esquizontes, uma vez que a replicação de merozoítos nos eritrócitos é limitada (Conrad *et al.*, 1985; Conrad *et al.*, 1986; Skilton *et al.* 2002; citados por McKeever, 2009).

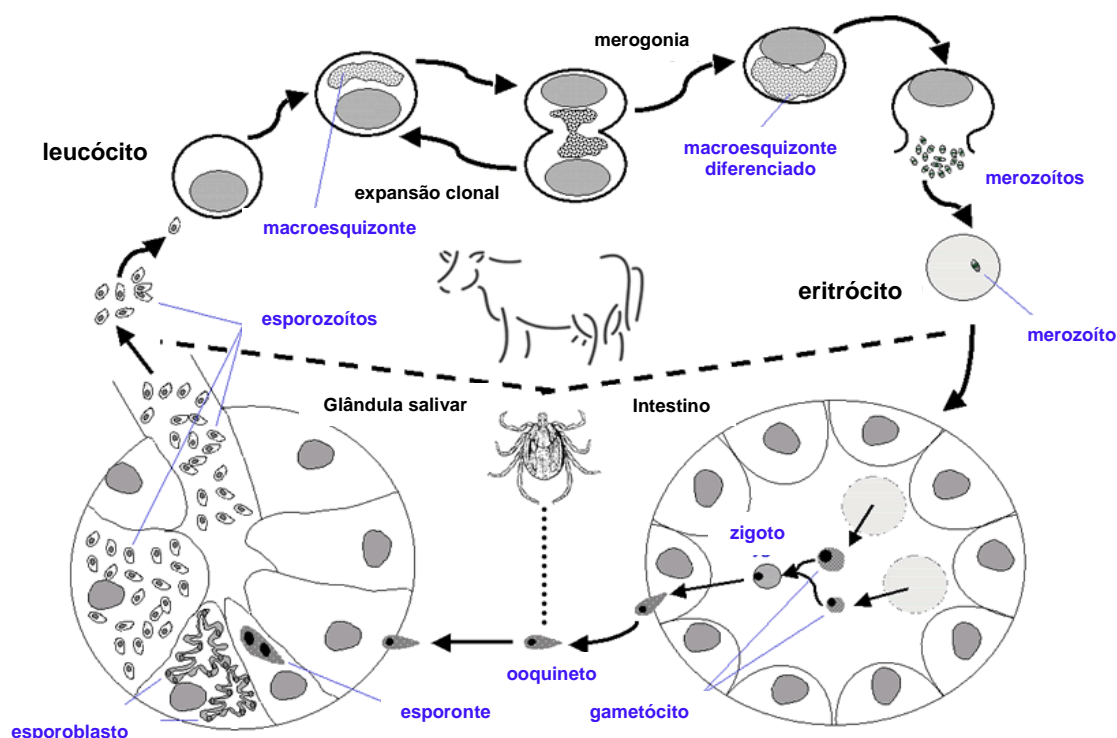
Quando o ixodídeo se alimenta num animal parasitado, os eritrócitos (juntamente com os merozoítos) chegam ao aparelho digestivo e após a digestão libertam os merozoítos no lúmen intestinal, que evoluem até adquirirem forma radial ou digitiforme (corpos radiados). Estas estruturas darão origem a microgâmetas (masculinos) e macrogâmetas (femininos), que, após fecundação, originam o ovo ou zigoto. É de realçar que o zigoto surge seis dias após a sucção de sangue pelo ixodídeo.

Após um período de 14 a 30 dias, o ovo adquire capacidade de locomoção (ooquinetos) e atravessa a parede intestinal, localiza-se na hemolinfa e migra até às glândulas salivares (Navarrete *et al.*, 2002). Após atingir células especializadas (tipo III) dos ácinos das glândulas salivares, iniciam um processo de divisão nuclear para formar esporoblastos multinucleados (McKeever, 2009). Nesta fase de esporogonia, o parasita permanece nas células alveolares das glândulas salivares, até ao aparecimento de um novo hospedeiro, momento em que o mecanismo de multiplicação nuclear é activado. Os esporoblastos dão

origem à formação dos esporozoítos uninucleados infectantes, transportados pela saliva da carraça até ao sangue do novo hospedeiro vertebrado (Navarrete *et al.*, 2002; McKeever, 2009).

Figura 2 – Ciclo de vida de *Theileria* spp.

(Adaptado de Wellcome Trust Project for Tropical Theileriosis, 2007, <http://www.theileria.org>)



1.3. Vectores de *Theileria* spp.

Os ixodídeos constituem um grave problema para os bovinos, na medida em que são transmissores de várias doenças, como é o caso da Teileriose. Para além da transmissão de hemoparasitas, os ixodídeos podem causar danos directos, tais como inflamação no local de fixação (que, conforme o local, pode originar dor, prurido, paralisia e acções tóxicas), a perda de pêlo e a infecção secundária das lesões, por bactérias ou míases. Outra consequência directa da alimentação dos ixodídeos é a espoliação de sangue, que pode provocar anemia nos animais fortemente infestados (Campillo & Vázquez, 2002; Rajput, Hu, Arijo, Habib & Khalid, 2005).

Os parasitas do género *Theileria* são transmitidos por ixodídeos, vulgo carraças. Diferentes géneros e espécies destes vectores, transmitem espécies de *Theileria* diferentes. *Theileria annulata* é transmitida por carraças do género *Hyalomma* (CFSPH, 2009; McKeever, 2009). As espécies *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum* e *Hyalomma lusitanicum* são transmissoras de *Theileria*

annulata e encontram-se em grande número na região mediterrânica (Ogre, 1999, citado por Durrani, 2008).

Figura 3 - *Rhipicephalus appendiculatus*
(Fonte: http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/THE/THE_001.jpg)



Figura 4 - *Hyalomma marginatum*
(Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hyalomma_marginatum.jpg)



As espécies *T. buffeli* e *T. sergenti* são transmitidas por *Haemaphysalis* spp. e a espécie *T. mutans* é transmitida por *Amblyomma* spp.. A espécie *T. taurotragi* é transmitida por ixodídeos do género *Rhipicephalus* (CFSPH, 2009).

O vector mais importante para *Theileria parva* é *Rhipicephalus appendiculatus*. A espécie *Rhipicephalus zambeziensis* no Sul de África e *Rhipicephalus duttoni* em Angola, também disseminam o agente da Febre da Costa Oriental.

Os ixodídeos podem permanecer infectados na pastagem até dois anos, dependendo das condições climáticas (OIE, 2009).

2. Epidemiologia

A epidemiologia desta doença depende da inter-relação entre a biologia e distribuição de ixodídeos e da resposta dos hospedeiros definitivos (Navarrete *et al.*, 2002).

A compreensão da epidemiologia da Teileriose requer o conhecimento dos mecanismos envolvidos na manutenção de um estado endémico (Young, 1981, citado por Fandamu, 2005). Este estado é definido quando coexistem o hospedeiro, o agente, o vector e o ambiente. Neste caso, a grande maioria da população está infectada e imune desde os seis meses de idade e, clinicamente, não há expressão da doença ou ocorre raramente (Moll *et al.*, 1984, citado por Fandamu, 2005). A estabilidade endémica de Teileriose depende de uma combinação de mecanismos reguladores envolvidos no desenvolvimento de factores de protecção contra infecções por *Theileria*, do nível de infecção na população de vectores e do número de ixodídeos que parasitam os bovinos (Young, 1981, citado por Fandamu, 2005).

Billiouw (2005), citado por Fandamu (2005), sugeriu que o critério mais importante para discriminar os estados epidemiológicos da Febre da Costa Oriental foi a evolução da prevalência da infecção, seguido da idade do primeiro contacto e da taxa de mortalidade. Billiouw propôs uma nova classificação dos estados epidemiológicos para a Febre da Costa Oriental:

- a) Epidemia, quando a idade do primeiro contacto é elevada, a taxa de mortalidade é aproximadamente 100% e a prevalência tem tendência para aumentar;
- b) Estabilidade endémica de primeiro nível, quando a idade do primeiro contacto é menor que dois anos, a taxa de mortalidade é próxima de 50% e a prevalência de infecção é estável;
- c) Estabilidade endémica de segundo nível, quando o primeiro contacto ocorreu até aos dois anos, a taxa de mortalidade é cerca de 25%, enquanto a prevalência da infecção é estável;
- d) Estabilidade endémica final, quando a idade do primeiro contacto é inferior a seis meses, a taxa de mortalidade é próxima dos 0% e a prevalência é estável.

2.1. Transmissão

A principal forma de transmissão é através do hospedeiro invertebrado. A transmissão iatrogénica também está descrita, sendo que os animais se infectam quando contactam com sangue de animais com Teileriose (por exemplo, através de agulhas hipodérmicas contaminadas) (Navarrete *et al.*, 2002; CFSPH, 2009). A transmissão transovárica não ocorre nos parasitas pertencentes ao género *Theileria* (CFSPH, 2009).

A transmissão de *Theileria* spp. pelos ixodídeos é transtadial, isto é, se o ixodídeo ingere o parasita como larva, transmite-o como ninfa, se o ingere como ninfa, transmite-o quando adulto. No caso de um ixodídeo adulto se alimentar de um bovino infectado, como se trata de um “fundo de saco” (não existe fase evolutiva posterior), o parasita permanece no hospedeiro invertebrado até à sua morte (Navarrete *et al.*, 2002).

Os esporozoítos de *Theileria* são transmitidos a um animal susceptível através da saliva da carraça vector. As espécies *T. parva* e *T. annulata* sofrem maturação e localizam-se na saliva do hospedeiro invertebrado após fixação deste ao bovino. Segundo Navarrete *et al.* (2002), normalmente, só após três a cinco dias de fixação é que o ixodídeo se torna infectante. Contudo, se a temperatura ambiente for elevada, os esporozoítos infectantes podem desenvolver-se mais rapidamente. Os esporozoítos de *T. parva* podem, inclusive, desenvolver-se nos ixodídeos que se encontram na pastagem e podem ser transmitidos para o bovino, horas após a fixação (CFSPH, 2009).

Se um animal recuperar da infecção, adquire um estado de portador latente, em que um baixo número de eritrócitos permanece infectado por piroplasmas. Estes animais têm um

papel importante na transmissão da infecção através da carraça-vector *Hyalomma* spp. (d'Oliveira, Weide, Habela, Jacquet & Jongejan, 1995).

Um animal portador é aquele que sobrevive à primeira infecção e mantém o parasita no estado infeccioso (“piroplasma”) em circulação no sangue, em níveis suficientemente elevados para infectar as carraças mas, geralmente, não apresentando sintomatologia clínica e não sendo detectado pelos exames parasitológicos normais (Medley, Perry & Young, 1992, citado por Fandamu, 2005). Estes animais são, muitas vezes, os principais responsáveis pela perpetuação da infecção dentro de uma exploração.

A interacção entre o parasita e o hospedeiro envolve variações na susceptibilidade do hospedeiro, na virulência de *Theileria* spp. e na dose infectante destes parasitas. Quando os efectivos bovinos são mantidos, durante anos, em zonas endémicas, a severidade da infecção diminui (Barnett, 1977).

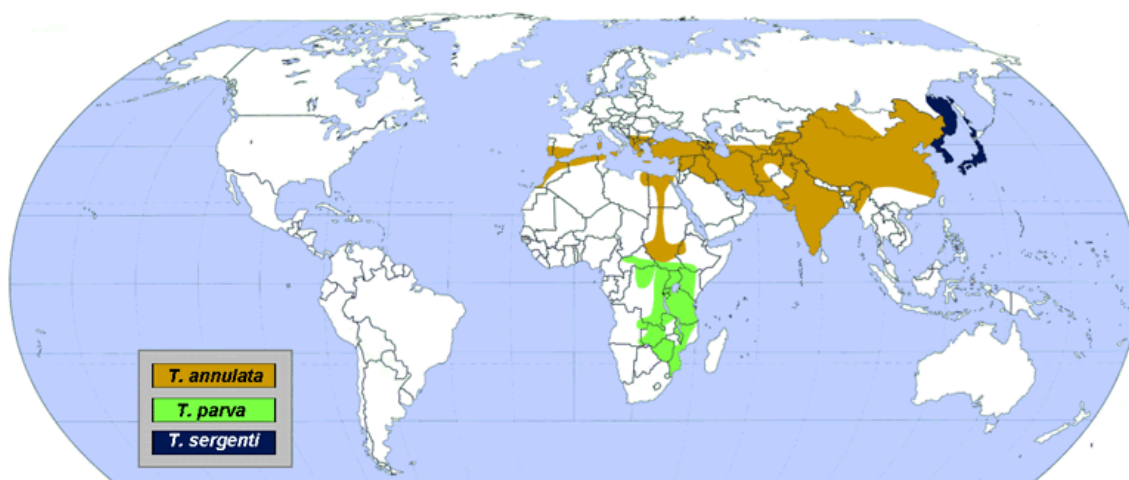
2.2. Distribuição geográfica

As duas doenças, com maior impacto económico, provocadas por parasitas do género *Theileria*, são a Teileriose Tropical, também designada por Febre da Costa Mediterrânica, provocada por *T. annulata* e a Febre da Costa Oriental (do inglês “East Coast Fever”), causada por *T. parva*.

A Teileriose Tropical ocorre no Norte de África, no Sul da Europa (toda a zona Mediterrânea), no Médio Oriente e em toda a Ásia Meridional (CFSPH, 2009; McKeever, 2009). Esta doença causa perdas económicas importantes, que vão desde quebras na produtividade até à morte dos bovinos afectados (Aktas, Dumanli & Angin, 2004; Glass *et al.*, 2003).

A febre da Costa Oriental é prevalente no Sul do Sudão, nas zonas central, este e Sul de África e a oeste do Zaire.

Figura 5 – Distribuição mundial das principais espécies de *Theileria* em bovinos
(Fonte: Wellcome Trust Project for Tropical Theileriosis, 2007, <http://www.theileria.org>)



Theileria annulata representa um problema epidemiológico diferente, pois os bovinos afectados constituem reservatórios permanentes de infecção para os ixodídeos.

Em regiões onde é endémica, a Teileriose Tropical é menos letal, a nível de efectivo, do que a causada por *Theileria parva*, mas como *Theileria annulata* se encontra amplamente distribuída, a soma total das perdas pode ser maior (Barnett, 1977).

A Teileriose Tropical representa uma séria ameaça para a saúde dos bovinos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com cerca de 240 milhões de animais em risco (Morrison *et al.*, 2007).

2.3. Teileriose em Portugal

Em Portugal, particularmente nas regiões do Alentejo e Ribatejo, as doenças, de maior importância, transmitidas por ixodídeos, que afectam os bovinos, são a Teileriose, causada por *T. annulata*, a Babesiose causada por *Babesia bigemina* e por *B. bovis* e a Anaplasmose, provocada por *Anaplasma marginale* (Caeiro, 1999, citado por Brígido *et al.*, 2004).

Existem muito poucos trabalhos publicados sobre a presença de Teileriose bovina, no país. Contudo, existem registos desta doença, principalmente de casos crónicos em adultos, em vários laboratórios nacionais de diagnóstico veterinário. Já em 1945, o Professor Doutor José Luís Silva Leitão, no trabalho “Teileriose bovina em Portugal”, alertou para a elevada quantidade de animais infectados por *Theileria* spp.. Presume-se, pois, que a Teileriose, causada por *Theileria annulata*, seja endémica no Sul do país, sendo a região Centro também afectada (Leitão, 1945, citado por Branco, 2009). Os parasitologistas portugueses consideram-na uma infecção com patologia moderada, devido à frequente identificação deste parasita em esfregaços sanguíneos de animais assintomáticos (Branco, 2010).

Em Portugal, estão presentes ixodídeos do género *Hyalomma*, reconhecidos como transmissores da Teileriose Tropical. Estes vectores são encontrados, principalmente no Ribatejo e no Alentejo, onde foram identificadas as espécies *Hyalomma lusitanicum* e *Hyalomma marginatum marginatum* (Caeiro, 1999; Habela *et al.*, 1999, citado por Branco, 2009).

Das espécies pertencentes ao género *Theileria*, que infectam bovinos, *T. annulata* é a única, considerada patogénica, identificada em Portugal (Leitão, 1945; Caeiro, 1973, citados por Branco, 2009). Existem suspeitas de infecção por *T. mutans* (Caeiro, 1973, citado por Branco, 2009), embora esta espécie, considerada não patogénica, seja mais frequente em África (Campillo & Vázquez, 2002). As espécies do grupo *T. buffeli* / *T. orientalis* / *T. sergenti*, responsáveis pela Teileriose “benigna”, uma infecção, geralmente, assintomática também foram identificadas em Portugal (Brígido *et al.*, 2004; Gomes, Santos-gomes & Botelho, 2010). Estas espécies podem ocorrer em associação com *T. annulata* (Georges *et al.*, 2001).

Em Portugal, as infecções por *T. annulata* têm sido registadas apenas na zona Sul do país (Caeiro, 1999; Centeno-Lima *et al.*, não publicado, citado por Brígido *et al.*, 2004). O diagnóstico é efectuado, principalmente, por observação microscópica de esfregaços sanguíneos e por testes serológicos. Contudo, a utilização do método de RLB (Reverse line blot), numa exploração do Alentejo, permitiu diagnosticar a presença de *T. annulata* em 80% (30/34) bovinos, que não apresentavam sintomatologia (Brígido *et al.*, 2004). Em Espanha, os casos de Teileriose Tropical ocorrem, na maioria das vezes, nas zonas Sul e Este do país, onde o ixodídeo vector, *Hyalomma* spp., é endémico, transmitindo *T. annulata*. Contudo, foram observados ixodídeos deste género em bovinos de regiões do Norte de Espanha, apontando para a possibilidade da alteração da distribuição da Teileriose Mediterrânica (García-Sanmartín *et al.* 2006).

Antunes (2008) estudou a prevalência de hemoparasitas em 100 bovinos da Companhia das Lezírias, SA, situada na região do Ribatejo. O diagnóstico foi efectuado por observação microscópica dos esfregaços sanguíneos. A prevalência total de animais positivos para hemoparasitas foi de 78%. A prevalência de animais infectados por *Babesia* spp. foi de 76%, seguida de 52% de animais positivos para *Anaplasma* spp.. No que se refere ao género *Theileria* spp., a prevalência foi de 27% dos animais infectados. Na população em estudo, existiam 28,2% dos animais com infecções simples, 44,9% com infecções duplas e 26,9% com infecções triplas. A associação *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. foi a mais prevalente (29%), seguida da associação *Babesia* spp. com *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp. (21%).

Brígido *et al.* (2004) pretenderam conhecer a prevalência de hemoparasitas num grupo de bovinos da raça Mirandesa da região do Norte de Portugal (distrito de Bragança). Através da aplicação do método de PCR, observaram que cerca de 2,6% (3/116) dos bovinos se encontravam infectados por *Theileria* spp. e/ou *Babesia* spp.. De seguida, foi aplicado o

teste RLB às três amostras positivas, que revelou a presença de parasitas pertencentes ao grupo *Theileria buffeli*/*T. orientalis*/*T. sergenti*. Estes resultados foram confirmados por sequenciação e análise filogenética de genes do RNA ribossomal, onde se obteve uma homologia de 99% com a espécie *T. buffeli* (Brígido *et al.*, 2004).

A região Norte de Trás-os-Montes (da qual faz parte o distrito de Bragança) não é considerada uma zona de elevada prevalência de hemoparasitas transmitidos por ixodídeos (Caeiro 1999, citado por Brígido *et al.* 2004). As condições climáticas desta região caracterizam-se por um clima temperado com várias zonas de microclima, não propícias à presença de ixodídeos. A baixa carga de ixodídeos e o facto de não pertencerem ao género *Hyalomma*, podem ser as razões para o baixo número (3/116) de animais portadores de *Theileria* spp. e/ou *Babesia* spp. identificados neste estudo.

Por outro lado, o manejo dos bovinos na região do Norte de Portugal baseia-se, na maior parte dos casos, na produção de um pequeno número de animais num espaço confinado, contrariamente à região do Sul do país, onde os animais são mantidos em regime extensivo, em grandes áreas de campo. Este facto, associado ao clima Mediterrânico, contribuem para que os bovinos estejam em contacto com elevadas cargas de ixodídeos, principalmente, pertencentes ao género *Hyalomma*, existentes naquela região.

Contudo, a identificação de bovinos portadores é um parâmetro epidemiológico importante, mesmo na região do Norte de Portugal, na medida em que estes animais podem tornar-se reservatórios do parasita e ser infectantes para os vectores, tornando-se numa fonte de disseminação de *Theileria* spp. (Brígido *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, em Portugal, têm surgido infecções por *T. annulata* em vitelos, com características bastante patogénicas, acabando por ser fatais, na maioria dos animais.

Branco *et al.* (2010) estudaram 15 casos de infecção aguda por este parasita, em vitelos com idade igual ou inferior a quatro meses, na região Sul de Portugal. Estes vitelos apresentavam lesões nodulares cutâneas multifocais, semelhantes a linfoma maligno multicêntrico. A infestação por ixodídeos do género *Hyalomma* era intensa. Através da observação de esfregaços sanguíneos e de linfonodos, foram identificadas formas parasitárias compatíveis com *Theileria* spp.. A infecção por *T. annulata* foi confirmada através de isolamento de células infectadas por esquizontes e sequenciação do fragmento codificante da região hipervariável 4 do gene de RNA ribossomal 18S. Durante a necrópsia, puderam observar-se nódulos hemorrágicos na pele, no tecido subcutâneo, nos músculos esquelético e cardíaco, na faringe, na traqueia e na serosa intestinal. Histologicamente, estes nódulos eram formados por células linfoblastóides, semelhantes a células neoplásicas. Através de técnicas de imunohistoquímica, estas células foram identificadas como sendo, maioritariamente, linfócitos T e macrófagos e poucos linfócitos B. Também foram identificadas células infectadas por *T. annulata*, através do uso de anticorpos monoclonais, o que permitiu a primeira caracterização fenotípica da(s) estirpe(s) existentes em Portugal.

Assim sendo, pode concluir-se que as alterações patológicas observadas foram devidas à proliferação dos macrófagos infectados por esquizontes, que, por sua vez, estimularam a multiplicação descontrolada de linfócitos T não infectados.

Estes casos de infecções agudas por *T. annulata*, com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, nunca tinham sido reportados em Portugal. Assim sendo, é possível que se tenham estabelecido, neste país, estirpes mais patogénicas de *T. annulata* ou que os factores epidemiológicos se tenham alterado, contribuindo para um aumento da carga de ixodídeos e de *Theileria* spp. e/ou para uma maior susceptibilidade do hospedeiro vertebrado (Branco *et al.* 2010).

Gomes *et al.* (2010) pretenderam detectar e identificar as espécies de *Theileria* e *Babesia* presentes em bovinos, na região Sul de Portugal, mais precisamente nos distritos de Beja, Évora e Portalegre. Nesse sentido, foram aplicadas técnicas de biologia molecular, nomeadamente PCR e testes de RLB, a uma amostra constituída por 267 bovinos desses distritos. Foram detectados parasitas pertencentes aos géneros *Theileria* e/ou *Babesia* em 48,7% (130/267) dos bovinos estudados. A espécie *Theileria annulata* foi detectada em 35,6% dos bovinos, seguida da espécie *Theileria buffeli/orientalis* (15%) e da espécie *Babesia bigemina* (6,4%). A prevalência de infecções mistas foi de 4,8%.

É importante e necessário alargar este estudo a todo o território nacional, na medida em que o conhecimento da ocorrência, da distribuição e da prevalência destes parasitas em Portugal, permitirá delinear estratégias de controlo para todo o país (Gomes *et al.*, 2010).

Com as alterações ambientais que se fazem notar e com o aumento da ocorrência destas doenças, torna-se ainda mais importante a implementação de metodologias de monitorização regular e programas de vigilância, em Portugal (Brígido *et al.*, 2004).

2.4. Factores de risco

Um dos factores mais importantes na epidemiologia das hemoparasitoses, como a Teileriose, é a distribuição dos vectores, responsáveis pela transmissão do parasita. Esta distribuição é condicionada pelas condições climáticas e ambientais, sendo que os ixodídeos são considerados parasitas sazonais (Navarrete *et al.*, 2002).

As temperaturas baixas impedem o desenvolvimento do ciclo e a actividade da maioria das espécies de ixodídeos (diapausa), enquanto temperaturas elevadas levam a um aumento da actividade, a um desenvolvimento mais rápido do ciclo de vida e a uma diminuição da mortalidade. Cada espécie tem um intervalo de temperatura óptimo para o seu desenvolvimento. A humidade relativa elevada favorece a sobrevivência das carraças e permite-lhes permanecer em actividade durante mais tempo. Assim sendo, em determinadas regiões do Sul da Península Ibérica, o clima do Inverno pode ser favorável

(temperaturas médias anuais de 16-18 °C e precipitação anual de 500-1000 mm), permitindo a existência dos vectores de *Theileria* spp..

Em Portugal, os ixodídeos dos géneros *Hyalomma* e *Rhipicephalus* são considerados “carraças de Verão” (Caeiro, 1999).

Outro factor condicionante é o regime da exploração bovina. Se se tratar de uma exploração em regime intensivo, existe um maior encabeçamento, logo um maior risco de contágio. Contudo, as condições necessárias à presença de ixodídeos estão, mais facilmente, reunidas numa exploração em que os animais estejam em regime de pastoreio, onde a vegetação abundante, a temperatura e humidade relativa elevadas são propícias ao desenvolvimento do hospedeiro invertebrado.

Ao introduzirmos um animal, pela primeira vez, numa zona endémica, este desenvolve doença, sendo que as taxas de mortalidade são de 5 a 10% para raças autóctones e de 80 a 90% para raças exóticas. Este factor limita a importação de raças melhoradas para zonas endémicas de Teileriose, pois há o risco de elevadas perdas económicas (Navarrete *et al.*, 2002).

Quando a Febre da Costa Oriental ocorre numa zona não endémica pode matar cerca de 90% de população bovina susceptível. Em zonas endémicas, este valor é muito menor, principalmente em bezerros, expostos a infestações moderadas de carraças, que só desenvolveram infecções subclínicas (Mehlhorn, 2001).

Em suma, para compreendermos a epidemiologia da doença é necessário compreendermos a distribuição dos vectores e das diferentes espécies de *Theileria* e quais os mecanismos imunitários dos animais (Morrison *et al.*, 2007).

3. Patogenia

A patogenia da Teileriose é condicionada por uma série de factores extrínsecos e intrínsecos, dependentes da espécie de *Theileria* e da capacidade imunitária do hospedeiro definitivo (Navarrete *et al.*, 2002).

A patogenicidade de *T. parva* e *T. annulata* caracteriza-se pela capacidade de parasitar os leucócitos do hospedeiro e levá-los a uma proliferação descontrolada. Ambas as espécies são responsáveis por causar doenças que se caracterizam, numa primeira fase, por serem linfoproliferativas e, numa fase mais tardia, linfodestrutivas (OIE, 2008). Contudo, o tropismo celular é diferente para ambas as espécies. Enquanto *T. parva* infecta todas as subpopulações de linfócitos, *T. annulata* infecta monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (Morrison & McKeever, 2006, citado por McKeever, 2009).

Este parasita dissemina-se rapidamente pelo sistema linfático e por vários órgãos, induzindo a produção do factor de necrose tumoral (TNF- α) e do interferão- γ (INF- γ). Estas e outras citocinas levam a uma desregulação fisiológica do hospedeiro. A presença de parasitas

nas glândulas adrenais e na hipófise também favorece o aparecimento de alterações nos sistemas imunitário e endócrino (Ramazan & Ugur, 2007). As citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) produzidas pelas células mononucleares infectadas são responsáveis pelos seguintes sinais clínicos: depressão, hipertermia, anorexia, caquexia e hemorragias disseminadas (Forsyth, 1999, citado por Ramazan *et al.*, 2007 & Glass *et al.*, 2003).

A acção patogénica dos parasitas do género *Theileria* pode dividir-se em três fases:

1) Fase linfoproliferativa: é a fase mais importante do ponto de vista patogénico, com formação dos esquizontes (entre o 5º e o 8º dias do período de incubação). Primeiramente, localizam-se nos linfonodos mais próximos do local de inoculação, que hipertrofiam. Os esquizontes são detectados em amostras de biópsia de linfonodos superficiais e de fígado, no período de 6 a 28 dias pós-infecção. O desenvolvimento destas formas parasitárias conduz a uma série de alterações celulares, com formação de grandes células linfoblastóides, levando à divisão celular e, consequentemente, parasitária. Os esquizontes rupturam-se e os merozoítos são libertados. Nesta fase da doença, ocorre panleucopénia e detectam-se as formas parasitárias. No final desta fase, as células parasitadas podem ser detectadas no timo, nas placas de Peyer, na lâmina própria do Aparelho Digestivo e no tecido intersticial do pulmão.

2) Fase de desorganização e depleção: nesta fase começam os fenómenos de atrofia e necrose linfóide (baço, placas de Peyer, tonsilas e medula óssea), acompanhada de uma grande infiltração de linfoblastos infectados, principalmente no tecido intersticial dos pulmões e na lâmina própria do aparelho digestivo. A nível pulmonar, dão origem a um quadro edematoso grave, acompanhado de dispneia, característica das fases terminais da doença. Como consequência da linfocitólise ocorre libertação de enzimas proteolíticas, coagulação intravascular disseminada (CID), resultante da libertação de produtos de degradação do fibrinogénio (PDF), e, por outro lado, ocorre a activação do complemento, que exerce acção sobre as aminas vasoactivas e provoca contracção do músculo liso. Ambas as vias levam ao aumento da permeabilidade e edema pulmonar, principal causa de morte num processo de Teileriose. Nos animais que superam a fase de edema pulmonar, desenvolve-se epiteliação alveolar, formação de membranas hialinas e fibrose, dificultando a função pulmonar.

3) Fase hemoproliferativa e hemolítica: após o aparecimento de merozoítos (2 a 3 dias após o aparecimento dos esquizontes, os merozoítos podem ser detectados em amostras de sangue periférico), produzidos durante a fase de merogonia, ocorre ruptura dos linfócitos e penetração nos eritrócitos. Nesta fase, observam-se linfopoiese e proliferação de linfoblastos, que é intensa em infecções por *T. parva*, moderada no caso de *T. annulata* e escassa quando se trata de *T. mutans*. É uma fase de grande importância clínica, devido à replicação massiva das formas parasitárias no interior dos eritrócitos (Navarrete *et al.*, 2002; Pipano & Shkap, 2002, citado por Shkap, Leibovich, Krigel, Fish & Orgad, 2010).

4. Imunidade

A resposta imunitária é complexa e depende da espécie e dose infectante, por um lado, e do estado hígido do hospedeiro e sua raça, por outro (Navarrete *et al.*, 2002).

Os parasitas veiculados por artrópodes, como é o caso de *Theileria* spp., enfrentam grandes desafios ao evitar as defesas do hospedeiro, pois têm de se replicar no interior do hospedeiro intermediário. Logo, a diversidade antigénica de *Theileria* é influenciada tanto pelo vector, como pelo hospedeiro vertebrado. (McKeever, 2009).

T. annulata e *T. parva* invadem as células do sistema imunitário e alteram a sua função (McKeever, 2009). Os bovinos que sobrevivem a uma infecção por *T. annulata* ou *T. parva* estão bem protegidos contra infecções subsequentes com estirpes homólogas, mas podem adoecer se se tratarem de estirpes heterólogas (Preston, Brown, Bell-Sakyi, Richardson & Sanderson, 1992, citado por McKeever, 2009).

Como podemos ver no ciclo de vida de *Theileria* spp., os esquizontes localizam-se no interior dos leucócitos, promovendo a proliferação e uma rápida expansão clonal das células parasitadas. Devido ao facto de o parasita permanecer dentro das células, a imunidade é, essencialmente, mediada por células T (Mehlhorn, 2001).

Assim sendo, as células T são as mais importantes na resposta imunitária contra estes hemoparasitas, quer na modulação de produção de citocinas como pelo efeito lítico, pelo que tanto as células T CD4+, como as CD8+ estão envolvidas (Ahmed, 1989, citado por Ahmed *et al.*, 2008).

As células T-citotóxicas e T-helper reconhecem os antígenos parasitários, apresentados pelas células infectadas via complexo maior de histocompatibilidade (major histocompatibility complex, MHC) classe I e II, respectivamente.

Os anticorpos são capazes de neutralizar os esporozoítos, contudo não previnem o início da infecção, pois só são produzidos numa fase mais tardia (Ahmed *et al.*, 2008).

Enquanto as células T infectadas induzem infecções graves, podendo levar à morte, as células B produzem uma resposta auto-limitante (Mehlhorn, 2001).

As células T- helper respondem à presença de células infectadas através da produção de interleucina-2 (IL-2) e interferão- γ (IFN- γ) (Ahmed, 1989, citado por Ahmed *et al.*, 2008). A IL-2 é consumida pelos linfócitos T citotóxicos (para a sua expansão clonal), que destroem as células-alvo que apresentam moléculas pertencentes a MHC I.

Para além da imunidade adquirida, a imunidade inata também é importante na protecção contra *Theileria* spp. e constitui a primeira linha de defesa, composta por células epiteliais, fagócitos, linfócitos especializados designados por “natural killer” (NK) e proteínas, como as do complemento (Ahmed *et al.*, 2008).

A proliferação celular que ocorre na fase em que as células estão parasitadas por esquizontes de *Theileria* spp. é a mais importante do ponto de vista patogénico. Estas células infectadas induzem a proliferação de linfócitos T “naive”, que activam linfócitos Th1 a produzir grandes quantidades de INF- γ (Campbell *et al.*, 1997).

O linfonodo regional, do local de inoculação de *Theileria* spp., sofre hipertrofia devido à acumulação de células infectadas e linfócitos T. As principais causas para a patologia observada são os níveis elevados de IFN- γ e de citocinas pró-inflamatórias (Glass *et al.*, 2005). As citocinas parecem também contribuir para o crescimento das células infectadas. Pensa-se que a IL-2, produzida pelas células T, contribui para o crescimento das células parasitadas através da ligação aos receptores da IL-2 (IL-2R), por acção parácrina (Ahmed *et al.*, 2008). Por outro lado, Nichani, Craigmile, Spooner & Campbell (1998) defenderam que a resposta dos linfócitos T citotóxicos não é eficaz durante a infecção aguda por *T. annulata*, devido à interrupção da produção de IL-2, que acontece quando as células T CD4+, activadas pelas células parasitadas, abandonam o linfonodo regional.

Ahmed *et al.* (2008) alertaram para a importância dos monócitos e macrófagos no controlo da proliferação de células não específicas. Numa cultura de vários linfócitos, células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), de animais imunizados, inibiram o crescimento de células parasitadas, de forma independente ao MHC. Esta inibição do crescimento foi demonstrada pela redução da incorporação de [3 H]-timidina. Contudo, PMBCs de animais não imunizados não interferiram com o crescimento das células parasitadas, indicando que dentro dos PMBCs dos imunizados existe uma subpopulação com efeito citostático no crescimento das células parasitadas. Estas células foram designadas como células citostáticas (cytostatic acting cells, CACs) e podem induzir a lise de células infectadas, que se tornam incapazes de incorporar [3 H]-timidina, secretam óxido nítrico que inibe a replicação do parasita e conduzem à apoptose da célula infectada (Visser, Abraham, Sakyi, Brown & Preston, citado por Ahmed *et al.* 2008). As CACs são capazes de produzir TNF- α , que inibe a proliferação celular (Ahmed *et al.*, 1992; Preston, Brown & Richardson, citados por Ahmed *et al.* 2008). Os macrófagos podem controlar a infecção através da redução da proliferação de células T, que consequentemente, levará à redução da produção de IL-2 e IFN- γ , pois ambas contribuem para o crescimento de células infectadas (Campbell *et al.*, 1997; Ahmed & Mehlhorn, 1999). Esta diminuição das células parasitadas, permite a criação de uma resposta imunitária específica e efectiva, que primeiro é dirigida à fase de esquizonte.

A função das células “natural killer” (NK) não está bem definida, mas pensa-se que podem actuar como células efectoras, por lise inspecífica de células parasitadas ou podem produzir IFN- γ para activar macrófagos (Preston, Brown & Richardson, citados por Ahmed *et al.* 2008).

A actividade das citocinas pró-inflamatórias está associada a muitos dos sinais clínicos da Teileriose Tropical. A sua função depende do momento da infecção em que são produzidas e do local de actuação. Tanto podem ser destrutivas em casos agudos, como podem funcionar como parte protectora da resposta imunitária. As células infectadas por *T. annulata* expressam mRNA para várias citocinas tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Brown, Campbell, Russel, Hopkins & Glass, 1995). Quanto maior a quantidade de citocinas produzidas por linhas celulares, mais grave é o decorrer da infecção no hospedeiro (Campbell *et al.*, 1997). Por outro lado, como já vimos, TNF- α e IFN- γ podem ter um papel fundamental no controlo da infecção, na medida em que interferem na diferenciação dos esquizontes, prevenindo novas infecções (Preston, Brown & Richardson, citados por Ahmed *et al.* 2008).

Tem-se observado que a resposta imunitária contra *T. parva* tem impacto na identificação do parasita em infecções subsequentes, mas não previne a diferenciação de formas parasitárias transmissíveis. Por outro lado, as composições genóticas dos parasitas transmitidos variam, segundo diferenças imunitárias individuais, com fenótipos MHC diferentes. Logo, a intensidade de selecção em locais onde a doença é endémica, pode ser influenciada pela dimensão da vacada e variabilidade de MHC (Katzer, Ngugi, Schnier, Walker & McKeever, 2007).

Na infecção por *T. parva*, a principal resposta imunitária é mediada pelo MHC I, nomeadamente através da acção dos linfócitos T citotóxicos. Por sua vez, os esquizontes de *T. annulata*, infectam os macrófagos e os linfócitos B. A infecção de macrófagos por *T. annulata* activa a libertação de citocinas, que ajudam na apresentação do antigénio às células T CD4+. Estas produzem IFN- γ , que induz os macrófagos não infectados a produzirem TNF- α e óxido nítrico (NO), que destroem as células infectadas por esquizontes e os eritrócitos com merozoítos.

As células B produzem anticorpos que, juntamente com o NO, neutralizam os merozoítos (extracelulares) e os piroplasmas (intracelulares) (OIE, 2008).

4.1. Susceptibilidade à infecção

Os bovinos de raças exóticas são mais susceptíveis à Teileriose Tropical do que os bovinos de raças autóctones. Enquanto a infecção induz uma doença grave, por vezes mortal em *Bos taurus taurus* susceptíveis e em bovinos cruzados, *Bos taurus indicus* desenvolvem imunidade e apresentam sintomatologia menos grave, possivelmente devido à activação da imunidade inata. Num estudo recente foi demonstrado que a divergência acima referida ocorre devido a diferenças durante o estado de macroesquizonte (Glass *et al.* 2005).

Por outro lado, as raças susceptíveis produzem quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias, que desencadeiam respostas exuberantes, enquanto que nas raças de *Bos*

indicus, os macrófagos conseguem controlar essas quantidades exuberantes de citocinas em circulação (Glass & Jensen, 2007). Assim sendo, será teoricamente possível identificar os genes responsáveis pela maior resistência a *Theileria* spp. (Ahmed *et al.*, 2008). Muitas das raças bovinas europeias, altamente produtivas, são particularmente sensíveis à doença e isso impede o melhoramento genético dos animais em regiões endêmicas (Morrison *et al.*, 2007).

Enquanto uma infecção por *T. annulata* pode conferir protecção cruzada contra outras estirpes da mesma espécie, na infecção por *T. parva* este processo não ocorre. No que diz respeito às idades, pode afirmar-se que os vitelos são mais susceptíveis, apresentando sintomatologia exuberante e taxas de mortalidade mais elevadas do que os bovinos adultos. Nestes, a infecção por *T. annulata* é, na maioria das vezes, subclínica, levando a diminuições da produção de carne e leite (CFSPH, 2009).

5. Sinais clínicos

Os sinais clínicos de Teileriose são inespecíficos, podendo ser associados a qualquer outra doença.

De um modo geral, pode afirmar-se que o período de incubação da Teileriose ocorre entre o décimo e o vigésimo quinto dias, enquanto o período pré-patente (até ao aparecimento de formas parasitárias nos eritrócitos) varia entre os 4 e os 14 dias (Navarrete *et al.*, 2002).

No caso da Febre da Costa Oriental, o período de incubação situa-se entre os 8 e os 12 dias, em animais experimentalmente infectados, mas pode alcançar as três semanas em animais naturalmente infectados. No que se refere à Teileriose Tropical, este período é cerca de uma a três semanas (CFSPH, 2009).

Os animais afectados pela Teileriose Tropical exibem diversos sinais clínicos, sendo os mais comuns: hipertermia (temperatura > 39,5 °C), membranas mucosas pálidas, linfadenopatia generalizada, apatia, anorexia, caquexia e sialorreia (Mehlhorn, 2001; Navarrete *et al.*, 2002; Ramazan *et al.*, 2007 & CFSPH, 2009). Como o parasita *Theileria annulata* leva à destruição dos eritrócitos, os animais infectados apresentam icterícia, anemia e, em alguns casos, hemoglobinúria (CFSPH, 2009).

A hipertrofia generalizada dos linfonodos ocorre durante a fase de desenvolvimento dos macrosquizontes dentro dos macrófagos e de outras células do sistema imunitário. Ocorre também perda de condição corporal e da massa muscular, devido à libertação de citocinas pelas células infectadas (CFSPH, 2009). Num estudo efectuado por Ramazan *et al.* (2007) os sinais clínicos observados foram: hipertrofia dos linfonodos pré-escapulares, hipertermia, inapetência, caquexia, corrimento nasal mucoso, hemorragias, dispneia, ataxia ruminal, protusão do globo ocular, lacrimejo e conjuntivite. Em alguns casos, podem ocorrer abortos,

devido à existência de febre e anemia em fêmeas gestantes (Navarrete *et al.*, 2002; CFSPH, 2009).

Quando a Teileriose Tropical se manifesta de forma aguda ou hiperaguda, os sinais clínicos surgem, aproximadamente, 7 dias após a infecção e caracterizam-se por febre elevada, apatia, anorexia, anemia, linfadenopatia generalizada, nódulos cutâneos e petéquias nas mucosas. Por vezes, pode ocorrer diarreia e icterícia.

Nos estados terminais da Teileriose Tropical, os animais podem apresentar diarreia hemorrágica. A morte pode ocorrer dentro de 15 a 25 dias depois da infecção por *Theileria annulata*, nos casos de doença aguda (OIE, 2009; CFSPH, 2009).

No que se refere à Febre da Costa Oriental, pode afirmar-se que o primeiro sinal clínico é, normalmente, a hipertrofia dos linfonodos parotídeos, devido ao facto da orelha ser um dos principais locais de fixação do ixodídeo vector. Segue-se uma linfadenopatia generalizada e o aparecimento súbito de febre que pode atingir os 42 °C (Mehlhorn, 2001 & OIE, 2009).

As mucosas da conjuntiva e da boca apresentam-se hemorrágicas e com petéquias. O animal apresenta anorexia que leva à deterioração da condição corporal.

A opacidade da córnea, a rinorreia, a sialorreia, o corrimento ocular, a dispneia e a diarreia são outros dos sinais clínicos que também podem ocorrer.

Nos animais susceptíveis, a mortalidade pode atingir os 100%. Antes da morte, a temperatura corporal do animal diminui e este apresenta rinorreia e dispneia severa, devido ao edema pulmonar (OIE, 2009). A morte, normalmente, ocorre 5 a 25 dias após a infecção (Mehlhorn, 2001).

Nos bovinos que conseguem recuperar, a doença crónica resulta em atrasos no crescimento dos vitelos e em perdas da produtividade nos animais adultos, mas estes constituem uma minoria dos animais que recuperam da doença aguda.

Na maioria dos casos, a doença é subclínica, principalmente em regiões endémicas, devido à imunidade estabelecida nessas populações bovinas. Assim sendo, os animais tornam-se portadores assintomáticos, mas com alguns efeitos na diminuição dos índices produtivos e reprodutivos (OIE, 2009).

Como consequência da anemia e das lesões pulmonares, o animal pode apresentar taquicardia e taquipneia, que à medida que o quadro clínico se agrava, podem levar à morte do animal por insuficiência cardiorespiratória.

Esporadicamente, em regiões endémicas, os animais infectados por *T. parva*, podem desenvolver um síndrome nervoso, designado “turning sickness”. Nestes casos, as células infectadas (linfócitos com esquizontes) obstruem os capilares sanguíneos cerebrais, desencadeando a presença de trombos, embolias e necrose isquémica no cérebro do animal (CFSPH, 2009; OIE, 2009).

Os índices de morbilidade e de mortalidade variam conforme a susceptibilidade do hospedeiro, a estirpe e a dose do parasita. No que se refere à Teileriose Tropical, é mais grave em raças não autóctones, com taxas de mortalidade de 40 a 90%, e na ordem dos 3% nas raças autóctones. Nos casos de Febre da Costa Oriental, a taxa de mortalidade pode atingir os 100% num efectivo de bovinos taurinos (*Bos taurus taurus*) ou zebu (*Bos taurus indicus*) de uma região não endémica. Em raças de bovinos autóctones da região endémica, a taxa de mortalidade é menor, mas a taxa de morbilidade é próxima dos 100%. (CFSPH, 2009).

El-Deeb & Younis (2009), estudaram quais os sinais clínicos, causados por infecção por *Theileria annulata*, num grupo de búfalos (*Bubalus bubalis*), mantido em contacto com bovinos, e constataram que todos apresentavam febre, aumento dos linfonodos, anorexia e membranas mucosas pálidas. Alguns animais também exibiam dispneia, corrimento ocular e opacidade da córnea, enquanto uma menor quantidade de animais encontrava-se também com lesões cutâneas, diarreia e descargas nasais. Estes sinais clínicos estão em conformidade com os descritos por Ahmad, Ahmad & Ahmad (2007) e por Durrani *et al.* (2008).

As espécies *T. mutans*, *T. sergenti* e *T. buffeli/orientalis* podem causar anemia ou aumentar a gravidade dos sinais clínicos em animais co-infectados com *T. parva* ou *T. annulata*. Contudo, são espécies que, normalmente, causam sinais moderados, comparativamente à Febre da Costa Oriental ou à Teileriose Tropical. A espécie *T. velifera* é considerada não patogénica (CFSPH, 2009).

6. Alterações laboratoriais

A análise dos parâmetros hematológicos de uma animal infectado por *Theileria* spp. pode ser um indicador da gravidade da infecção, por um lado e uma ferramenta auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no tratamento a efectuar, por outro. A análise dos parâmetros bioquímicos também pode ser útil para compreender a patogenia da doença (Ramazan & Ugur, 2007).

No estudo efectuado por Ramazan & Ugur, (2007), os animais infectados por *T. annulata*, quando comparados com os do grupo controlo, apresentavam aumento das enzimas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transferase (GGT) e creatinina-quinase (CK). Os valores de bilirrubina, creatinina e ureia também se encontravam aumentados. Por outro lado, verificou-se uma diminuição da glucose, proteína total, albumina, triglicéridos, colesterol, cálcio e fósforo, em relação aos parâmetros normais. A presença de parasitas, em qualquer tecido, provoca lesões. O aumento das enzimas hepáticas, ALT e AST, está relacionado com alterações da função hepática e reflecte as lesões hepáticas, presentes nos casos de Teileriose (Forsyth *et al.*, 1999, citado por

Ramazan & Ugur, 2007). As lesões hepáticas causadas por *T. annulata* incluem necrose, alteração da estrutura dos hepatócitos e infiltração dos linfócitos nas zonas periportais, indicando alterações do sistema hepatobiliar devido à hipóxia resultante da anemia (Sandhu *et al.*, 1998, citado por Saber, Khorrami & Nouri, 2008). O aumento da ALT e da AST está de acordo com os resultados observados por Saber *et al.* (2008).

A GGT é uma enzima, usada como um indicador sensível de doença hepática. Nos animais infectados por *T. annulata*, a GGT também apresentava um valor aumentado (Sandhu *et al.*, 1998, citado por Saber *et al.*, 2008). O aumento dos níveis de AST e CK também está relacionado com os danos e atrofia musculares, causados pelo decúbito prolongado em alguns casos de Teileriose (Ramazan & Ugur, 2007). O aumento dos níveis de bilirrubina deve-se à destruição dos eritrócitos por eritrofagocitose (que ocorre no baço, nos linfonodos e noutros órgãos do sistema mononuclear fagocitário), por um lado (Sandhu *et al.*, 1998, citado por Saber *et al.*, 2008) e à destruição hepática e anemia hemolítica, por outro (Omer *et al.*, 2003, citado por Saber *et al.*, 2008). O aumento dos níveis de creatinina pode estar relacionado com as lesões hepáticas e renais. Saber *et al.* (2008) verificaram um aumento de BUN (blood urea nitrogen), que pode ser devido às lesões renais.

Ramazan & Ugur (2007) atribuíram a hipoglicémia à utilização da glucose pelos parasitas e à lesão hepática causada pelos mesmos. Por sua vez, a hipoalbuminémia e hipoproteinémia devem-se à acumulação extravascular de fluidos proteicos (Stockman *et al.*, 2000). A diminuição dos níveis de colesterol e triglicéridos pode ser atribuída à anorexia e à diarreia (Singh *et al.*, 2001, citado por Ramazan & Ugur, 2007). A hipocalcémia verificada nos animais infectados por *T. annulata* é, provavelmente, devida à hipoalbuminémia, a uma diminuição da ingestão, a uma má absorção intestinal e a lesão renal. Esta e a diarreia são as possíveis causas de hipofosfatémia (Omer *et al.*, 2003, citado por Ramazan & Ugur, 2007). Contudo, no estudo efectuado por Saber *et al.* (2008) verificou-se a ocorrência de hiperfosfatémia, que pode resultar da anemia hemolítica, causada pela hemólise imunomediada.

O aumento do número de reticulócitos, verificado na Teileriose, está relacionado com a destruição de eritrócitos, pois a anemia estimula a produção de precursores dos eritócitos. A reticulocitose, tal como a anemia, é observada em estados mais avançados da doença (Singh *et al.*, 2001, citado por Ramazan & Ugur, 2006).

A contagem de eritrócitos, o valor de hematócrito e as concentrações de hemoglobina estão diminuídas nos animais infectados, assim como o MCHC ("mean corpuscular haemoglobin concentration", concentração de hemoglobina corpuscular média), enquanto o MCV ("mean corpuscular volume", volume corpuscular médio) está aumentado, traduzindo-se numa anemia macrocítica hipocrômica (Ramazan & Ugur, 2006). À medida que a parasitémia aumenta, observa-se um aumento do MCV e do MCHC, indicativos de uma anemia macrocítica hiperocrômica. A macrocitose e a policromasia, observadas nos esfregaços

sanguíneos, indicam a presença de anemia regenerativa nos animais infectados. Esta anemia regenerativa é acompanhada pela presença de reticulócitos, que explicam o aumento de MCV, enquanto o aumento de MCHC pode ser devido à hemólise extravascular dos eritrócitos infectados (Nazifi, Razavi, Hasanshahi & Esmailnezhad, 2009).

O mecanismo subjacente à ocorrência de anemia não é totalmente conhecido, contudo várias factores têm sido sugeridos. A remoção dos eritrócitos infectados, por macrófagos (eritrofagocitose) (Campbell *et al.*, 1999; Singh *et al.* 2001; citados por Ramazan & Ugur, 2006) parece ser a causa principal de anemia, apoiada pelo facto da actividade das enzimas antioxidantes ser diminuída pela acção dos parasitas, provocando uma maior fragilidade dos eritrócitos, que são mais rapidamente fagocitados (Yagi, Thongnoon, Shiono & Chikayama, 2002, citados por Ramazan & Ugur, 2006; Shiono, Yagi, Chikayama, Miyazaki & Nakamura, 2003). As citoquinas pró-inflamatórias, principalmente a TNF- α , também parecem estar implicadas na ocorrência da anemia na Teileriose tropical (Forsyth *et al.*, 1999, citado por Ramazan & Ugur, 2007; Graham *et al.*, 2001) Por sua vez, o aumento dos níveis dos produtos de activação do complemento podem provocar diminuição de RBC ("red blood cell"), contribuindo para a manutenção dessa anemia (Omer *et al.*, 2002, citado por Ramazan & Ugur, 2006). Grewal, Ahuja, Singha & Chaudhary (2005) concluíram que o stress oxidativo e a peroxidação lipídica nos eritrócitos de bovinos infectados por *T. annulata*, poderiam ser a causa da fragilidade dos eritrócitos e da lise das suas membranas. Esta fragilidade osmótica dos eritrócitos pode aumentar à medida que o nível de parasitemia também aumenta (Nazifi *et al.* 2008, citado por Nazifi *et al.*, 2009). Assim sendo, é possível que os mecanismos antioxidantes, que protegem os eritrócitos dos danos oxidativos, estejam alterados na infecção por *T. annulata*, induzindo a perioxidação lipídica nas membranas daqueles, provocando anemia nos bovinos infectados (Nazifi *et al.*, 2009).

Ramazan & Ugur (2006) observaram que os eritrócitos infectados por *T. annulata* apresentavam morfologia anormal, como protusões irregulares, que se devem à presença do parasita no seu interior, à oxidação do eritrócito, à presença de trombos intravasculares e à resposta imuno-mediada (Stockman *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2001, citado por Ramazan & Ugur, 2006). Nazifi *et al.* (2009) verificaram que as alterações morfológicas dos RBC (red blood cells), assim como as formas anormais (esferócitos) aumentavam com a progressão da parasitemia. A presença de outras anomalias na forma dos eritrócitos, tais como corpos de Howell-Jolly e macrócitos, indicam o aumento da hematopoiese, como resposta da medula óssea, à anemia (Stockman & Scott, 2002; Latimer, Mahaffey & Prase, 2003; citados por Nazifi *et al.*, 2009).

Ramazan & Ugur (2006) observaram uma diminuição do número de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos nos bovinos infectados por *T. annulata*. El-deeb & Younis (2009) observaram as mesmas alterações num grupo de búfalos infectados pelo mesmo parasita. Outros estudos revelaram que, imediatamente após a infecção, o número de leucócitos aumenta,

diminuindo dentro de alguns dias. A leucopénia é principalmente mediada pela citocina TNF- α (Sandhu *et al.*, 1998; Forsyth *et al.*, 1999; citados por Ramazan & Ugur 2006). Esta diminuição do número de leucócitos está relacionada com a destruição dos linfócitos nos órgãos linfóides e com a sua infiltração em vários órgãos (Omer, 2002 citado por Ramazan & Ugur, 2006). Os defeitos de coagulação existentes, traduzem-se por uma diminuição do tempo de tromboplastina parcial activado e do tempo de protrombina, devido a uma diminuição da síntese hepática e aumento do consumo dos factores de coagulação (Ramazan & Ugur, 2006). A trombocitopénia deve-se à destruição plaquetária e maior consumo no sangue periférico e à supressão da libertação pela medula óssea, devido à presença do parasita (Yagi *et al.*, 2002, citado por Ramazan & Ugur, 2006). Pensa-se que as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), libertadas pelos macrófagos/monócitos infectados, ao induzirem a libertação de mediadores inflamatórios, como a elastase ou os radicais livres de oxigénio, possam contribuir para a ocorrência das alterações de coagulação observadas (Ramazan & Ugur, 2006).

Em suma, o hemograma revela anemia, com diminuição acentuada do valor do hematócrito, leucopénia, que no final do quadro clínico pode passar a leucocitose e eosinofilia, característica das infecções parasitárias. A icterícia deve-se à hiperbilirrubinémia, que pode ser directa ou indirecta. Os valores das transaminases e das globulinas encontram-se aumentados, enquanto os valores da glucose, da albumina e do ferro estão abaixo dos parâmetros normais (Navarrete *et al.*, 2002).

A anemia, acompanhada da bilirrubinémia, é um dado laboratorial significativo na Teileriose Tropical, ao contrário do que acontece na Febre da Costa Oriental. Nesta, os sinais laboratoriais mais comuns são a panleucopénia e a trombocitopénia (Radostits, Gay, Blood & Hinchcliff, 2000). Embora a diminuição dos leucócitos e do nível de plaquetas seja menos acentuada na Teileriose tropical, a linfocitopénia (principalmente com diminuição dos linfócitos T) torna-se bastante marcada, em estados mais graves e avançados da doença (Preston *et al.*, 1992, citado por Radostits *et al.*, 2000).

Segundo a experiência efectuada por Navarrete *et al.* (2002), ao inocularem *T. annulata* em bovinos, verificou-se que o valor do hematócrito manteve-se dentro dos parâmetros normais e fisiológicos (cerca de 39% para a espécie bovina) durante os primeiros 12 dias pós-infecção. Depois, este valor começou a descer até atingir o valor de 24%, que coincidiu com o momento em que os níveis de parasitémia foram máximos. Isto deveu-se ao facto do elevado poder hemolítico da *Theileria annulata*. Após a aplicação de um tratamento sintomático aos animais infectados, os autores puderam observar a subida do valor do hematócrito, que atingiu valores fisiológicos 38 dias após a inoculação dos esporozoítos. Outras alterações laboratoriais que podem estar presentes são a hemoglobínúria e a bilirrubinúria (Radostits *et al.*, 2000).

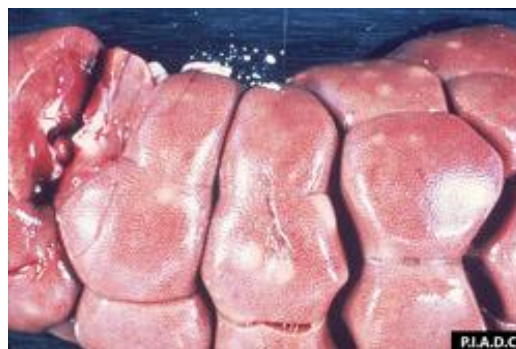
7. Lesões *post-mortem*

Nas infecções subagudas, causadas tanto por *T. parva* como por *T. annulata*, as únicas lesões *post-mortem* são a hiperplasia linfóide e múltiplas hemorragias disseminadas pela superfície dos órgãos. Nas infecções agudas, podem observar-se várias hemorragias e petéquias no tecido subcutâneo, mais comuns nos casos de Teileriose tropical. Normalmente, os linfonodos estão hipertrofiados e podem encontrar-se hiperplásicos, hemorrágicos e edematosos. Contudo, podem tornar-se necróticos e atrofiados nos casos crônicos (principalmente nos bovinos com Febre da Costa Oriental) (CFSPH, 2009).

Figura 6 - Linfonodo poplíteo de bovino - Hipertrofia do linfonodo e presença de petéquias (Fonte: CFSPH, http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/THE/THE_006.jpg)



Figura 7 - Rim de bovino com múltiplos focos pálidos, devido à infiltração linfóide (Fonte: CFSPH, http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/ImageDB/THE/THE_008.jpg)



Hepatomegália e esplenomegália também podem ocorrer. No fígado, assim como nos rins, usualmente, observam-se numerosos focos brancos, devido à infiltração celular linfóide.

As alterações observadas no coração, encontram-se no miocárdio, com sinais de degenerescência e hemorragias.

O tracto gastrointestinal, particularmente o abomaso e o intestino delgado, também podem apresentar úlceras hemorrágicas. As placas de Peyer podem sofrer necrose.

Nas serosas, podem verificar-se extensas zonas com petéquias, equimoses hemorrágicas ou necrose, enquanto as cavidades peritoneal e pleural podem conter líquido seroso (Ahmad *et al.*, 2007; OIE, 2009).

Os sinais respiratórios são comuns na Febre da Costa Oriental. Assim sendo, os animais afectados costumam apresentar exsudado espumoso em torno das narinas. Nestes casos, os pulmões encontram-se congestionados, contendo bastante líquido, sendo que o enfisema interlobular e o edema pulmonar são lesões frequentes. Normalmente, o lúmen das vias respiratórias encontra-se preenchido por líquido espumoso. Contrariamente, nos casos de Teileriose Mediterrânica, os sinais respiratórios não são comuns. (CFSPH, 2009; OIE, 2009).

Entre outros sinais já mencionados, a hipertrofia dos linfonodos, as mucosas anémicas ou ictéricas, a atrofia muscular, o edema pulmonar e a enterocolite hemorrágica são outras lesões que podem ser observadas durante a necrópsia de animais infectados por *T. annulata* (OIE, 2008; OIE, 2009; CFSPH, 2009).

Ao contrário da Febre da Costa Oriental, que é caracterizada por uma resposta linfoproliferativa, devido à infecção dos linfócitos, a Teileriose Tropical conduz, primariamente, à infecção dos macrófagos. Por sua vez, esta infecção massiva, leva à estimulação de produção de citocinas, nomeadamente TNF- α , responsável por muitas das lesões observadas (OIE, 2008).

Histologicamente, dentro dos macrófagos infectados, presentes em vários órgãos, podem ser observados formas de macroesquizontes.

Nos casos de Febre da Costa Oriental, podem observar-se infiltrações de linfócitos imaturos em cortes histológicos de pulmão, rim, cérebro, fígado, baço e linfonodos (OIE, 2009).

8. Diagnóstico

O diagnóstico clínico de Teileriose é possível quando a doença se expressa na forma aguda ou crónica. Contudo, na maioria das regiões endémicas a doença manifesta-se na forma subclínica, pelo que o diagnóstico se torna difícil. Os dados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos apenas permitem a elaboração de um diagnóstico presuntivo. O diagnóstico definitivo apenas é possível através da observação de formas parasitárias por observação ao M.O., através do recurso a técnicas serológicas e moleculares. Estes tipos de diagnóstico serão abordados de seguida.

8.1. Diagnóstico microscópico

Para efectuar este tipo de diagnóstico é necessária a colheita de amostras de sangue periférico ou de material obtido por punção/biópsia de linfonodos, no caso de se tratar de um animal vivo. Os esfregaços sanguíneos são obtidos pela técnica de escorregamento total e corados pelo método de Giemsa. As amostras de tecidos ou órgãos também podem ser obtidos *post-mortem*. Neste caso, são realizados esfregaços por aposição dos fragmentos obtidos. (Navarrete *et al.*, 2002; Brígido *et al.*, 2004).

Através da observação ao microscópio óptico, detecta-se a presença de merozoítos dentro dos eritrócitos ou de micro/macroesquizontes no interior de macrófagos ou de linfócitos (CFSPH, 2009).

Do ponto de vista morfológico, as formas intra-eritrocitárias podem ser redondas, ovóides, anelares (*T. annulata*) ou em bastonete (*T. parva*). O seu tamanho é igualmente variável, oscilando entre 0,5 e 6 μ m de diâmetro/comprimento. Com técnicas de coloração como o

Giemsa, estas formas apresentam citoplasma eosinófilo com um grânulo basófilo de cromatina na sua extremidade. Os organismos podem aparecer isolados, em pares ou em tetradas (“cruz de Malta”) (Navarrete *et al.*, 2002).

Os merozoítos normalmente estão presentes no sangue dos animais portadores, mas em muitos casos não se conseguem detectar, pelo que o diagnóstico pode ser confirmado pela observação de esquizontes. Contudo, durante a fase aguda da Teileriose Tropical, não existem muitos esquizontes no sangue do animal. Estas formas parasitárias são mais facilmente encontradas em amostras de linfonodos, baço e fígado. No caso da Febre da Costa Oriental, os esquizontes podem ser observados nos leucócitos do sangue e em esfregaços de aposição de diversos tecidos/ órgãos colhidos durante a necrópsia. As formas parasitárias de *T. parva* são facilmente encontradas em amostras de pulmão, de linfonodo, de baço e de rim (CFSPH, 2009).

Os esquizontes podem ser encontrados dentro dos macrófagos/linfócitos ou extracelularmente e são um diagnóstico característico de infecções agudas por *T. parva* e *T. annulata*. Nas infecções por *T. mutans* ou pelo grupo *T. sergenti*/*T. buffeli*/*T. orientalis*, os esquizontes são transitórios. Os esquizontes de *T. taurotragi* não são detectados em esfregaços sanguíneos. Os esquizontes de *T. mutans*, distinguem-se dos de *T. parva*, por possuírem partículas nucleares maiores, achatadas e irregulares.

Os merozoítos de *T. parva*, *T. annulata* e *T. mutans* são semelhantes, mas normalmente, os de *T. annulata* e de *T. mutans* são maiores e podem ser vistos em divisão.

Em termos práticos, as características morfológicas (de esquizontes e merozoítos), observadas ao microscópio óptico, permitem a identificação do género do hemoparasita, contudo não são suficientes para distinguir as espécies de *Theileria* (Navarrete *et al.*, 2002; OIE, 2008). Por outro lado, um resultado negativo por observação de esfregaços sanguíneos, não exclui uma infecção latente. (OIE, 2008).

Outra forma de diagnóstico é a identificação de esquizontes, em cortes histológicos de tecidos/órgãos corados pela hematoxilina-eosina e pelo método de Giemsa.

Como esta identificação é difícil, pode obter-se um diagnóstico mais específico por imunohistoquímica, com a utilização de anticorpos anti-*Theileria*, em cortes de tecidos afectados (Renneker *et al.*, 2008).

8.2. Diagnóstico serológico

São conhecidos vários testes serológicos aplicáveis ao diagnóstico da Teileriose, tais como o teste de fixação do complemento, a hemaglutinação, a imuno-precipitação, a imuno-electroforese, a aglutinação em tubo capilar, a imunofluorescência indirecta (indirect fluorescent antibody, IFA) e o teste ELISA (“enzyme–linked immunosorbent assay”, ELISA).

Contudo, só este último pode ser capaz de detectar e diferenciar a imunidade induzida nos animais vacinados, da imunidade conferida por infecção natural (Manuja, Nichani, Kumar, Sharma, Kumar, 2001; Hashemi-Fesharki, Golchinfar, Madani & Esmaeilnia *et al.*, 2006).

Em fases mais tardias da doença e nos animais portadores, os testes serológicos são mais fiáveis porque a parasitémia pode apresentar níveis não detectáveis ao exame microscópico. Nestes estados, os títulos de anticorpos são significativamente mais elevados do que na fase inicial da infecção (Gubbels *et al.*, 1999).

Os anticorpos contra *T. parva* e *T. annulata* podem ser detectados com testes ELISA ou por imunofluorescência indirecta.

O método ELISA tem sido amplamente usado em estudos seroepidemiológicos. (Radostits *et al.*, 2000). Contudo, o IFA é o teste mais usado para o diagnóstico de *Theileria* spp. (OIE, 2008). Os testes serológicos podem não ser suficientemente sensíveis para detectar todos os animais infectados, dando origem a falsos-negativos nos animais portadores crónicos assintomáticos. Podem ainda ocorrer reacções cruzadas entre diferentes espécies do género *Theileria*, principalmente em testes IFA (CFSPH, 2009).

8.2.1. Testes de IFA

A sensibilidade de um teste IFA depende da fase da infecção, em que o animal se encontra. O antigénio utilizado pode ser uma suspensão de esquizontes ou de merozoítos. Se forem utilizados esquizontes como antigénio, os anticorpos contra *T. parva* e *T. annulata* são detectados, pela primeira vez, no 10º e no 14º dias pós-infecção, respectivamente. Se forem utilizados os merozoítos como antigénio, os anticorpos só são detectados aos 15º e 21º dias pós-infecção. O tempo de permanência dos anticorpos em circulação é variável e dependente de um conjunto de factores, tais como, o estabelecimento de um estado de portador, a ocorrência de intervenção terapêutica ou de novo contacto com o agente. Normalmente, as infecções por *T. parva* e por *T. annulata*, atingem níveis máximos de anticorpos, detectáveis entre os 30 e os 60 dias. Estes níveis vão diminuindo gradualmente, mas ainda são detectáveis 4 a 6 meses após a recuperação do animal (OIE, 2008).

Nas regiões onde a Febre da Costa Oriental é endémica, a seroprevalência de *T. parva*, na população bovina, oscila bastante, dependendo do nível e da regularidade da infecção (OIE, 2008). Num estudo seroepidemiológico de infecção por *T. parva* a sensibilidade do teste IFA foi de 55%, para uma titulação de 1/40 e de 28% para uma titulação de 1/160. A especificidade para os dois limiares de positividade foi de 86% e 95%, respectivamente (Billiouw *et al.*, 2005). Assim sendo, este teste é útil para identificar explorações que apresentem animais portadores, mas nem sempre é suficientemente sensível para detectar todos os animais infectados. Nas infecções experimentais por inoculação de esporozoítos de *T. mutans*, os anticorpos são detectados, pela primeira vez, 10 a 15 dias após o aparecimento de merozoítos. Durante cerca de um a dois anos são detectados títulos baixos

de anticorpos. No caso do diagnóstico de infecções por *T. parva*, os testes IFA são muito mais sensíveis se não existir co-infecção por outras espécies de *Theileria*. Se for esse o caso, a especificidade do teste tem de ser analisada cuidadosamente. As espécies *T. annulata* e *T. parva* apresentam reactividade cruzada, contudo esta tem pouco significado em termos práticos, pois a distribuição geográfica é diferente para ambas as espécies. No teste IFA, a espécie *T. mutans* não apresenta reactividade cruzada com *T. annulata*, nem com *T. parva*.

Apesar de o teste IFA apresentar bons resultados no diagnóstico de Teileriose quando esta é causada apenas por uma espécie, apresenta limitações, tais como uma baixa especificidade, quando co-existem várias espécies pertencentes ao género *Theileria*, pois apresenta problemas de reactividade cruzada (OIE, 2008). Este teste também está sujeito a uma interpretação subjectiva (Renneker, Abdo, Ahmed & Seitzer, 2009).

8.2.2. Testes de ELISA

Estes testes estão a ser cada vez mais usados, tendo sido adaptados com sucesso, na detecção de anticorpos contra *T. annulata* (Gray *et al.*, 1980, citado por OIE, 2008). Kachani *et al.* (1996), citado por OIE (2008), demonstraram que os ELISA conseguem detectar anticorpos por um período de tempo maior do que os testes IFA. Para além disso, os ELISA são menos sujeitos ao erro do operador, menos dispendiosos e permitem processar um elevado número de amostras de soro num curto espaço de tempo.

Os ELISA (baseados na detecção de anticorpos) apresentam sensibilidade e especificidade maiores do que os testes IFA. Contudo, são os ELISA indirectos, baseados na detecção de antígenos, os que mais têm sido usados no diagnóstico de infecções por *T. parva* (detecção do antígeno PIM, “polymorphic immunodominant molecule”) e *T. annulata* (detecção do antígeno p32). Estes ELISA apresentam sensibilidade e especificidade acima dos 95%. (Morzaria *et al.*, 1999, citado por OIE, 2008). O ELISA indirecto, que detecta o antígeno imunodominante da proteína de superfície de *T. annulata* (TaSP, *T. annulata* surface protein), foi usado para estudos epidemiológicos da Teileriose Tropical (Backeit *et al.*, 2004; Salih, *et al.* 2007; Seitzer *et al.*, 2007; citados por Renneker *et al.* 2009). Este teste revelou uma maior sensibilidade (99,1%), comparativamente ao IFA (Renneker *et al.*, 2009). Em alguns destes estudos, observaram-se reacções cruzadas com soros de bovinos experimentalmente infectados com *T. parva* e com *Trypanosoma* spp.. Assim, foi desenvolvido um ELISA competitivo (cELISA) para aumentar a especificidade na detecção de anticorpos circulantes contra TaSP. Como este antígeno revelou ser o que detecta, com maior sucesso, os anticorpos em animais infectados com *T. annulata*, a identificação de um anticorpo monoclonal que se ligue especificamente ao antígeno TaSP, seria ideal para o desenvolvimento de um cELISA (Renneker *et al.*, 2008). Estudos efectuados, revelaram que o cELISA apresentou menor sensibilidade (77,4%) e especificidade igual (100%), quando

comparado com o ELISA indirecto. As reacções cruzadas com *T. parva* observadas com o ELISA indirecto, deixam de ser observadas com o uso do cELISA. Assim, a utilização do cELISA parece ser útil em regiões onde podem estar presentes vários géneros e espécies de hemoparasitas, permitindo detectar a diversidade antigénica, através do uso de um painel de anticorpos monoclonais que detectem as diversas variantes antigénicas. Assim sendo, o cELISA pode ser adaptado para distinguir animais infectados com diferentes genótipos de parasitas e ser importante para estudos epidemiológicos de monitorização de programas vacinais (Renneker *et al.*, 2008).

Os testes ELISA são mais viáveis para estudos epidemiológicos e de monitorização em larga escala, pois são mais económicos, mais fiáveis e facilmente padronizados. Por outro lado, o teste ELISA é mais fiável para identificar animais portadores infectados a longo prazo, pois a detecção de anticorpos é independente da presença de parasitas. As prevalências de infecção obtidas pela observação microscópica ou pela técnica de PCR, são mais baixas, pois a detecção do parasita ou do DNA do mesmo, pode não ser possível em animais portadores assintomáticos (Renneker *et al.*, 2009).

Os ELISA podem ser os testes de seromonitorização de animais vacinados. Hashemi-Fesharki *et al.* (2006) sugeriram que o teste ELISA, juntamente com o teste de hipersensibilidade retardada à teilerina, são os testes de eleição para monitorizar a duração da imunidade conferida pela vacina contra infecções por *T. annulata*, ajudando no estabelecimento de programas de vacinação, em países onde as taxas de morbilidade e mortalidade, devido à Teileriose, são elevadas. Contudo, este tipo de teste não está disponível comercialmente (OIE, 2009).

8.3. Diagnóstico molecular

As técnicas de diagnóstico molecular apresentam sensibilidade e especificidade muito mais elevadas do que o diagnóstico por observação microscópica e o diagnóstico serológico (Gubbels *et al.*, 1999).

8.3.1. Reação em cadeia de polimerase (“Polymerase chain reaction”, PCR)

A PCR é uma técnica de biologia molecular que permite identificar o género/espécie de *Theileria* em animais portadores ou na fase aguda da doença. Esta técnica permite a identificação de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) da espécie de *Theileria* presente no sangue ou no material aspirado por punção do linfonodo. Através da PCR, quantidades mínimas de DNA do parasita são amplificadas um milhão de vezes, pelo que a sensibilidade do teste é bastante elevada.

Foi desenvolvido um teste PCR específico para detectar fragmentos de ADN de *T. annulata* em amostras sanguíneas de bovinos portadores (d'Oliveira *et al.*, 1995; Habela *et al.*, 1999; Salih *et al.*, 2005, citados por Branco, 2009).

Oliveira *et al.* (1995) detectaram *Theileria annulata*, através de PCR, em amostras sanguíneas de bovinos e reportaram uma maior eficácia com o teste PCR (75%) do que através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos (22%). Num estudo efectuado por Durrani *et al.* (2008), a eficácia da observação microscópica foi de 39,9%, enquanto o diagnóstico por PCR revelou uma eficácia de 53,3%. Algumas das amostras positivas no diagnóstico de *T. annulata* por PCR não foram detectadas pelo exame ao M.O. Assim sendo, a PCR tem uma sensibilidade mais elevada quando comparada com o exame microscópico.

Morzaria *et al.* (1989 e 1999), citados por OIE (2008) estudaram e desenvolveram técnicas específicas para o diagnóstico de *T. mutans* e de *T. parva*.

A amplificação, por PCR, dos genes p33 e p34 das espécies pertencentes ao complexo *T. sergenti/T. buffeli/T. orientalis*, permite diferenciar *T. sergenti* de *T. buffeli/T. orientalis* (Kawazu, 1992, citado por OIE, 2008).

8.3.2. “Reverse line blot” (RLB)

Existem testes PCR específicos para diferentes espécies de agentes patogénicos transmitidos por ixodídeos. Contudo, esses organismos ocorrem, com frequência, simultaneamente, no mesmo animal. Estas associações estão relacionadas com a distribuição de ixodídeos numa determinada zona (Almería *et al.*, 2009). Assim sendo, é necessário um teste que detecte e diferencie, em simultâneo, protozoários e erliquias. Esse teste consiste na hibridização por RLB dos produtos resultantes do PCR, por oligonucleótidos específicos, imobilizados numa membrana, para detecção simultânea de diferentes espécies de agentes (Gubbels *et al.*, 1999).

Este teste foi originalmente desenvolvido para identificar os diferentes serótipos da bactéria *Streptococci* (Kaufhold *et al.*, 1994, citado por Isogen Life Science) e foi aplicado com sucesso na detecção e diferenciação de todas as espécies pertencentes aos géneros *Theileria* e *Babesia* (Gubbels *et al.*, 1999). De seguida, esta técnica também foi aplicada às espécies pertencentes aos géneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, permitindo o desenvolvimento de um “kit” RLB, que incluía 36 provas para as espécies pertencentes aos géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Babesia* e *Theileria*.

Desta forma, o RLB rapidamente se tornou num método de diagnóstico molecular, difundido por vários laboratórios a nível mundial e numa ferramenta bastante útil no estudo epidemiológico de diversos agentes, como *Theileria* spp..

Nijhof *et al.* (2003), recorrendo a esta técnica, identificaram uma nova espécie, *Theileria bicornis*, numa espécie de rinocerante, *Diceros bicornis*. Esta técnica foi também aplicada

com sucesso no estudo de hemoparasitas do género *Theileria* em bovinos da raça Mirandesa, em Portugal (Brígido *et al.*, 2004).

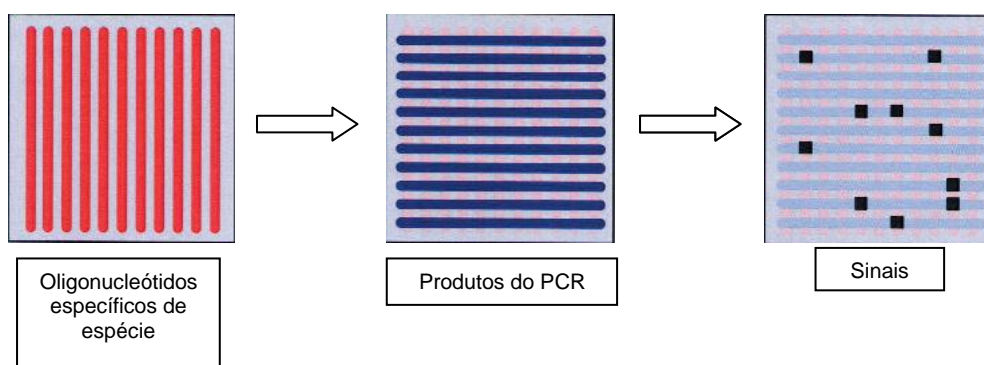
García-Sanmartín *et al.* (2006), recorreram à técnica de RLB em paralelo com a observação microscópica, para diagnóstico de *Babesia* spp. e *Theileria* spp.. Através da técnica RLB, foram detectados 72 amostras positivas para a presença de merozoítos, que foram consideradas negativas através do exame microscópico. Assim, através do RLB estimou-se 54% de amostras positivas, enquanto apenas 28% foram detectadas por observação ao M.O.. Apesar do RLB ser muito mais sensível, foram detectadas, por exame microscópico, 10 amostras positivas, que apresentaram resultado negativo no RLB. Isto pode dever-se a uma interpretação subjectiva na observação microscópica ou a má condição das amostras.

O RLB é uma técnica que detecta e diferencia os parasitas mencionados, no sangue, tecidos ou nos ixodídeos. Com a utilização deste teste, torna-se desnecessária a aplicação de PCR individuais a cada espécie, pois o RLB é baseado na amplificação por PCR das espécies correlacionadas (conjuntos *Ehrlichia/Anaplasma* e *Theileria/Babesia*). Cada espécie é identificada por um oligonucleótido-sonda, através da utilização de um aparelho “line-blotter”. Ao combinar a amplificação por PCR, com uma hibridização, o RLB torna-se num teste, pelo menos, 1000 vezes mais sensível do que o PCR usado individualmente.

Por outro lado, este teste torna-se mais económico, pois os oligonucleótidos podem ser reutilizados 10 a 20 vezes e o número de amplificações por PCR é reduzido. Este factor é uma grande vantagem principalmente em países com poucos recursos, onde as doenças transmitidas por ixodídeos são de extrema importância. Para além de ser capaz de detectar infecções causadas por vários agentes no mesmo animal, a elevada sensibilidade deste teste permite a detecção de portadores crónicos assintomáticos, servindo de reservatórios, que constituem um problema no controlo das piroplasmoses (Almería *et al.*, 2009). Ravindran *et al.* (2007) estudaram a aplicação do método PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) em bovinos infectados, simultaneamente, por *Babesia bigemina* e *Theileria annulata* e concluíram que esta técnica é importante para o estudo epidemiológico e identificação de dois dos agentes patogénicos transmitidos por carraças, mais comuns em alguns países, como é o caso da Índia. Esta técnica tem especificidade e sensibilidade elevadas, requisitos necessários e importantes para poder ser empregue em programas de controlo e estudos epidemiológicos (Ravindran *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de um kit RLB para a detecção simultânea de 4 géneros diferentes de parasitas, que têm os ixodídeos como vectores, é uma mais valia nos estudos epidemiológicos e de diagnóstico desta área, podendo contribuir de forma importante para a melhoria do controlo destas doenças (Isogen Life Science, 2004).

Figura 8 - Representação esquemática da técnica RLB (adaptado de Isogen Life Science, 2004)



A maior limitação apresentada pela PCR e pelo RLB é o facto de se tornarem testes dispendiosos (Renneker *et al.*, 2009). Por outro lado, a diversidade genética e antigénica dos parasitas varia com a distribuição geográfica, podendo levar a resultados falsos positivos ou negativos, a não ser que essa diversidade tenha sido testada na região em estudo (Kaya, Cakmak & Karaer, 2006).

8.4. Diagnósticos diferenciais

Segundo Radostits *et al.* (2000), Navarrete *et al.* (2002) e CFSPH (2009), os diagnósticos diferenciais de Teileriose, em bovinos, deverão ser feitos em relação a: Anaplasmoses, Babesioses, Tripanossomoses, Febre Catarral Maligna, Septicémia Hemorrágica, Peripneumonia contagiosa bovina, Leucose Bovina, "Heartwater" e Febre do Vale do Rift. Contudo, em Portugal as doenças mais importantes a ter em conta para o diagnóstico diferencial da Teileriose Tropical ou Mediterrânica, causada por *Theileria annulata*, são a Anaplasmoses e a Babesioses, pois as infecções mistas entre *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp. ou *Babesia* spp. são comuns em zonas endémicas (Antunes, 2008). Deve também ter-se em atenção, a diferenciação entre *T. annulata* e as outras espécies do género *Theileria*, identificadas em Portugal, como as pertencentes ao grupo *T. buffeli*/*T. sergenti*/*T. orientalis* (Brígido *et al.*, 2004).

8.4.1. Anaplasmoses

Nos bovinos, a Anaplasmoses resulta da infecção por *Anaplasma marginale* e por *A. centrale*. Estas espécies pertencem ao Reino PROTISTA, SubReino PROTOZOA, Filo APICOMPLEXA, Classe ESPOROZOA, Ordem RICKETTSIALES, Família ANAPLASMATACEAE, género *Anaplasma*. Estas riquetsias têm uma distribuição mundial. A diferenciação, por observação microscópica, entre estas duas espécies baseia-se na localização das formas parasitárias, no interior dos eritrócitos. Assim, *A. marginale* encontra-se na periferia do eritrócito, enquanto *Anaplasma centrale* localiza-se no centro do mesmo (Kreier, 1977). *A. marginale* é

responsável pela maior parte dos casos de doença clínica, enquanto *A. centrale* é responsável por sintomas mais moderados ou por doença subclínica. Recentemente, têm sido reportados casos de infecção por outra espécie, *A. phagocytophilum*, mas a sua ocorrência por infecção natural é rara e não tem expressão clínica. Estes hemoparasitas podem ser transmitidos por ixodídeos (os géneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* e *Ixodes*), que são os vectores principais, mas a transmissão por insectos ou iatrogénica também é possível (OIE, 2008). Ocorre transmissão transovárica no ixodídeo vector de *Anaplasma* spp., tal como *Babesia* spp. e contrariamente a *Theileria* spp..

As vacas que, já foram, ou que estão, infectadas por *Anaplasma* spp. transferem anticorpos para os vitelos, via colostro. A imunidade passiva dura cerca de três meses. De seguida, os animais expressam, normalmente, uma “resistência etária natural”, que dura até aos 9/12 meses de idade, sendo que neste período de vida do animal, é possível a coexistência de *Anaplasma* spp. e dos vectores, sem que os vitelos apresentem sintomatologia clínica. Se os bovinos não são expostos a *Anaplasma* spp. durante o seu crescimento, a sua resistência diminui e os animais adultos tornam-se susceptíveis, na maioria dos casos. Desta forma, se estes animais estiverem em contacto com animais infectados e na presença de ixodídeos vectores, a probabilidade de ocorrência de Anaplasmose é bastante elevada (HealthGene, 2008, citado por Antunes 2008).

Os sinais clínicos mais comuns da Anaplasmose são depressão, febre, anemia, icterícia, mas também pode ocorrer anorexia, perda de peso, obstipação alternada com diarreia, diminuição dos índices produtivos e reprodutivos e episódios de aborto (OIE, 2008).

8.4.2. Babesiose

A Babesiose bovina é uma doença transmitida por ixodídeos, amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, que resulta da infecção por protozoários do género *Babesia* (Reino PROTISTA, SubReino PROTOZOA, Filo APICOMPLEXA, Classe ESPOROZOA, Ordem PIROPLASMIDA Família BABESIIDAE). As três espécies que infectam os bovinos com maior frequência são: *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens*. As espécies *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* e *B. jakimovi* também podem infectar bovinos. Estes protozoários são intra-eritrocitários e a sua multiplicação leva à destruição dos glóbulos vermelhos. Os vectores mais importantes na transmissão de *Babesia* spp. são ixodídeos pertencentes ao género *Rhipicephalus*. Os sinais clínicos são vários e dependem da espécie e idade do animal e da espécie de *Babesia*. Normalmente, os adultos são mais afectados do que os vitelos, que permanecem assintomáticos, no geral, até aos nove meses de idade. Quanto ao parasita, *B. bovis* é, geralmente, uma espécie mais patogénica que *B. bigemina* e *B. divergens*. Os sinais clínicos mais comuns devem-se à hemólise provocada pela multiplicação do parasita no interior dos eritrócitos, que tem como consequência a presença de anemia,

frequentemente acompanhada de hemoglobinúria (sinal importante a ter em conta no diagnóstico diferencial de Anaplasmoses) e hemoglobinémia. Os animais apresentam febre, anorexia, depressão, fraqueza, taquicardia, taquipneia e membranas mucosas pálidas. A icterícia ocorre, principalmente, nos casos de doença subaguda (CFSPH, 2009).

8.4.3. Tripanossomose

Esta doença é provocada por protozoários da Família TRYPANOSOMATIDAE, transmitidos, na sua maioria, pela mosca glossina (*Glossina* spp.), vulgo mosca tsé-tsé. Este vector é endémico em países como Angola, Moçambique e Zimbabwe. As espécies *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* afectam o Homem e os animais, provocando a Tripanossomose Africana, vulgarmente conhecida por Doença do Sono. As espécies *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* e *T. brucei brucei* afectam, principalmente, os animais e provocam a Tripanossomose animal africana. Quando uma glossina infectada pica um animal, os parasitas são transmitidos pela saliva, contudo *Trypanosoma* spp. também pode ser transmitido iatrogenicamente (através de agulhas e instrumentos cirúrgicos infectados) ou pela picada de insectos, das famílias MUSCIDAE e TABANIDAE. Na maioria dos casos, a doença é crónica, mas pode expressar-se de forma aguda, com morte do animal em apenas uma semana. O primeiro sinal é o aparecimento de uma tumefacção no local da picada da mosca, seguida de febre intermitente, anemia, linfadenopatia e perda de peso. Em bovinos de aptidão leite, a produção pode diminuir. Também têm sido relatados sinais neurológicos, edema (devido a insuficiência cardíaca), diarreia e problemas oculares, como queratite e corrimento ocular (CFSPH, 2009).

8.4.4. Febre Catarral Maligna

A Febre Catarral Maligna (FCM) é uma doença grave, muitas vezes fatal, que afecta muitos mamíferos ungulados. Esta doença é causada por vários vírus do género *Rhadinovirus*, da família HERPESVIRIDAE. O herpesvírus-2 ovino (OHV-2), transmitido pelos ovinos, é o principal responsável pela FCM, enquanto o herpesvírus-1 alcelafino (AHV-1), endémico no gnu (*Connochaetes* spp.), está praticamente limitado ao continente africano e causa a FCM em bovinos e noutras espécies.

Outros vírus têm sido identificados como causadores de FCM em várias espécies de ruminantes selvagens. A FCM caracteriza-se por uma diversidade de sintomas, que variam conforme a espécie afectada. A infecção subclínica é comum nos hospedeiros reservatórios, mas também pode ocorrer em hospedeiros acidentais, como os bovinos. O quadro clínico caracteriza-se por depressão, anorexia, febre, linfadenopatia generalizada (sinais estes, coincidentes com a Teileriose), dispneia, descargas nasais e oculares mucopurulentes e conjuntivite. A pele pode estar eritematosa ou ulcerada e o animal pode apresentar gastroenterite com diarreia sanguinolenta. Por vezes, os animais apresentam incoordenação

motora, tremores e hiperestesia. As lesões *post-mortem* podem ser confundidas com quadros agudos de Teileriose, na medida em que os linfonodos encontram-se hipertrofiados e congestionados, as superfícies serosas podem apresentar petéquias, a mucosa do tracto gastrointestinal pode estar ulcerada e podem ocorrer lesões renais (Radostits *et al.*, 2000; CFSPH, 2008). Em 2001, foram relatados e confirmados três casos de FCM em Portugal, dois em bovinos de raça Minhota e um terceiro numa vaca Holstein (Cortez, Dias Pereira, Cortez, Mendonça & Thompson, 2002).

8.4.5. Septicémia Hemorrágica

Resulta da infecção por *Pasteurella multocida multocida*, uma bactéria Gram-negativa da Família PASTEURELLACEAE. Apenas dois serotipos desta bactéria são causadores da Septicémia hemorrágica. Conforme o sistema de classificação, cada serótipo de *P. m. multocida* pode adoptar dois nomes diferentes. Um é conhecido como serótipo B:2 (no sistema de “Carter-Heddlestone”) ou 6:B (no sistema “Namioka-Carter”), enquanto o outro serótipo é conhecido por E:2, de acordo com o primeiro sistema e 6:E, no segundo. Esta doença afecta principalmente os bovinos e os búfalos dos continentes africano e asiático e do Médio Oriente, mas também têm sido reportados casos em alguns países do Sul da Europa. A bactéria *Pasteurella multocida* transmite-se pela ingestão de água e alimentos contaminados, por inalação e através de fomites. A Septicémia hemorrágica surge, na maioria dos casos, de forma aguda. Os primeiros sinais clínicos são febre, apatia e depressão. De seguida, podem surgir sinais como sialorreia, secreção nasal abundante e edema submandibular, que pode passar a edema da barbeta e da zona do peito. Os vitelos podem apresentar gastroenterite com diarreia hemorrágica. Normalmente, os animais apresentam dispneia e morrem 6 a 48 horas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (CFSPH, 2009).

8.4.6. Peripneumonia contagiosa bovina

A Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) é uma das doenças infecciosas que causa maiores perdas em África, onde é endémica. Nas explorações em que os animais nunca contactaram com a doença, a taxa de mortalidade pode ser na ordem dos 80% e os bovinos que sobrevivem tornam-se portadores crónicos. Esta doença reapareceu em alguns países europeus nas décadas de 80 e 90, mas foi erradicada, tendo sido relatado o último caso em 1999. A PPCB é causada pelo organismo *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides*, do tipo colónias pequenas (SC, small-colony). A sua transmissão é feita, principalmente, através de aerossóis, directamente entre os animais, mas também pode ser transmitido pelo contacto com saliva, urina, membranas fetais e conteúdo uterino de animais infectados. É frequente a existência de animais portadores, que mantêm a infecção latente, sob a forma de sequestro dos organismos viáveis em lesões pulmonares encapsuladas. Os animais com

PPCB, na forma aguda, começam por apresentar febre, anorexia, depressão e diminuição da produção de leite (bovinos de aptidão “leite”). De seguida, surge a sintomatologia respiratória, que pode ir desde tosse, descargas nasais mucopurulentas e dispneia, que se agrava com o decorrer da doença. Os animais podem ainda apresentar epistaxis, diarreia e a ocorrência de abortos e nados-mortos também está documentada. Nos animais com idade inferior a seis meses, para além dos sinais respiratórios, típicos desta doença, pode surgir poliartrite. Os bovinos afectados de forma hiperaguda, normalmente, morrem três semanas após a infecção. A doença crónica é caracterizada por febre baixa recorrente, perda da condição corporal e sinais respiratórios (CFSPH, 2008). Estes animais são mais susceptíveis a outras doenças, como é o caso da Febre da Costa Oriental, endémica também em determinadas zonas do continente africano. Por outro lado, é importante o diagnóstico diferencial entre esta última e a PPCB, devido à presença de lesões pulmonares, existentes em ambas doenças.

8.4.7. Leucose Bovina

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é causada pelo vírus da leucose bovina (VLB), um retrovírus. A transmissão do VLB ocorre através da ingestão do colostro/leite pelo recém-nascido (até às três semanas de vida), por via iatrogénica (através de agulhas hipodérmicas e de material cirúrgico, entre outros), por via transplacentária (em 4 a 8% das vacas infectadas gestantes) e, mais raramente, por contacto directo (secreções nasais, brônquicas e traqueais e urina). Contudo, também é possível a transmissão por insectos vectores, como é o caso da espécie *Tabanus fuscicostatus* (mosca do cavalo). A maioria das infecções são subclínicas, mas 30 a 70% dos bovinos infectados apresentam linfocitose persistente, enquanto apenas 0,1 a 10% dos animais desenvolvem linfossarcomas em vários órgãos. Contudo há hipertrofia dos linfonodos superficiais em 75-90% dos casos de LEB. Embora os animais possam ser infectados com o VLB em qualquer idade, os tumores ocorrem, normalmente, em animais com mais de três anos de idade. Os sinais clínicos dependem dos órgãos afectados e podem ser muito inespecíficos, tais como anorexia, diminuição da condição corporal, pêlo baço, taquicardia, taquipneia, diarreia, aborto, edema da barbel, exoftalmia, parésia e paralisias. Os sinais mais específicos estão relacionados com uma hipertrofia generalizada dos linfonodos superficiais. A hipertrofia dos linfonodos viscerais ou a existência de tumores podem provocar compressão de órgãos como o esófago, provocando disfagia e timpanismo, da traqueia e dos pulmões, desencadeando dispneia e, também, compressão da jugular, que conduz a edema e dificuldades na circulação de retorno. Nos adultos, os tumores localizam-se com maior frequência nos linfonodos superficiais e viscerais, no abomaso e no coração, enquanto nos vitelos são os linfonodos viscerais, o baço e o fígado os órgãos mais afectados (OIE, 2008). Deve utilizar-se o termo LEB, apenas quando os linfomas são causados por infecção pelo VLB.

O termo Leucose Esporádica Bovina é, normalmente, reservado para os animais mais jovens, assim como para o linfoma cutâneo e do timo. Normalmente a(s) causa(s) da Leucose Esporádica não são conhecidas. Existem linfossarcomas que não se enquadram em nenhuma das duas condições descritas, como é o caso do linfoma multicêntrico de etiologia desconhecida (OIE, 2008). É importante fazer o diagnóstico diferencial entre a forma juvenil de Leucose Esporádica Bovina e a forma atípica de Teileriose Mediterrânica, observada em vitelos, pois ambas podem ter em comum o aparecimento de lesões cutâneas e a hipertrofia generalizada dos linfonodos. Contudo, a localização e as características das lesões observadas, em vitelos infectados por *T. annulata*, não estão totalmente de acordo com o quadro típico observado na variante juvenil da Leucose Esporádica Bovina. É, ainda, de salientar que a Teileriose está, por norma, associada a fortes infestações de ixodídeos (Branco, 2009).

8.4.8. “Heartwater” (Erlíquiose, ex-Cowdriose)

Esta doença resulta da infecção por *Ehrlichia* (*Cowdria*) *ruminantium*, um parasita intracelular obrigatório, pertencente à Ordem RICKETTSIALES, Família ANAPLASMATACEAE, que infecta ruminantes domésticos e selvagens. Algumas estirpes de *Ehrlichia ruminantium* são muito patogénicas. “Heartwater” é endémica na maior parte das regiões africanas a Sul do deserto do Sahara, nas ilhas de Madagáscar e nas Caraíbas. A espécie *Ehrlichia ruminantium* é transmitida por ixodídeos do género *Amblyomma*, sendo que pelo menos doze espécies podem ser transmissoras da riquetsia. *Amblyomma variegatum* é o principal vector em África e nas Caraíbas. Em África, esta doença pode surgir na forma hiperaguda, em raças não autóctones e é caracterizada por morte súbita. Antes de morrerem, os animais apresentam dispneia, hiperestesia, secreção lacrimal e diarreia severa, em algumas raças de bovinos. A forma aguda é a mais comum nos ruminantes domésticos, quer se tratem de raças autóctones ou exóticas e a morte ocorre passado uma semana. Os primeiros sintomas caracterizam-se pelo aparecimento súbito de febre, anorexia, letargia e dispneia. De seguida ocorrem sinais neurológicos, que podem ir desde movimentos de mastigação, protrusão da língua, contração das pálpebras e andar em círculos. Por vezes, os animais apresentam tremores musculares e podem tornar-se agressivos. Com a progressão da doença, o animal apresenta convulsões, e, nas fases terminais, movimentos de pedalar, hiperestesia, opistótono e nistagmo. A infecção subclínica pode ocorrer nos animais mais jovens e caracteriza-se apenas por febre passageira, pelo que a doença adquire o nome de “heartwater fever” (CFSPH, 2007).

8.4.9. Febre do Vale do Rift

A Febre do Vale do Rift é uma doença zoonótica, provocada por um vírus do género *Phlebovirus* (família BUNYAVIRIDAE), transmitido por mosquitos do género *Aedes*. Esta

doença é endémica na África subsariana. As epidemias ocorrem, nesta região, na época das chuvas, quando as larvas de *Aedes* eclodem. Nos animais, a Febre do Vale do Rift é caracterizada pela ocorrência de abortos em fêmeas ruminantes gestantes e por taxas de mortalidade elevadas nos animais jovens. Os vitelos podem apresentar febre, anorexia e depressão. A morte dos vitelos ocorre em 10 a 70% dos casos. Apesar do aborto ser o sinal clínico mais frequente nos bovinos adultos, estes também podem apresentar febre, anorexia, fraqueza, hipersíalía, icterícia, diarreia fétida e diminuição da produção de leite (CFSPH, 2007).

9. Prognóstico

De um modo geral, as infecções por *Theileria* spp. têm um prognóstico grave, podendo ocorrer a morte do animal em 3 a 20 dias após a infecção. No caso de haver recuperação, o animal adquire imunidade contra o parasita, tornando-se portador assintomático. Contudo o prognóstico é muito variável e depende de vários factores: a raça do bovino, isto é, se é autóctone de zonas endémicas ou se é um bovino de uma raça exótica (importado para uma zona endémica), a idade do hospedeiro, o seu estado higio-sanitário e nutricional e está também dependente da espécie, da estirpe e da quantidade de parasitas que infectam o bovino (Navarrete *et al.*, 2002; OIE, 2008).

Como já foi dito, a componente genética do bovino é um factor importante no prognóstico da doença, na medida em que raças autóctones de zonas endémicas, normalmente, desenvolvem infecções moderadas ou subclínicas, enquanto bovinos introduzidos ou de raças exóticas desenvolvem infecções graves.

O prognóstico pode ser mais favorável se se actuar nas primeiras fases da infecção, recorrendo ao uso dos fármacos adequados (Navarrete *et al.*, 2002).

10. Tratamento

Durante muitos anos, as tetraciclínas foram os agentes usados no tratamento da Teileriose, principalmente a clortetraciclina que demonstrou alguma eficácia contra as formas merogónicas dos leucócitos em infecções por *T. parva* (Navarrete *et al.*, 2002). As oxtetraciclínas de longa acção também podem ser usadas na terapêutica da Teileriose Tropical (Dhar, 1990; Singh, Thakur & Varshney, 1993; citados por Shkap, Leibovich, Krigel, Fish & Orgad, 2010).

A diaminazina (Berenil®) também actua contra os primeiros estados do parasita e continua a ser indicada devido à sua eficácia em co-infecções pelos hemoparasitas *Anaplasma* e *Babesia* ou quando ocorre infecção bacteriana (Navarrete *et al.*, 2002).

A eficácia do coccidiostático halofuginona foi demonstrada (*in vitro*), por alguns autores, contra as espécies *T. parva* e *T. annulata*. Mbawambo, Mkonyi & Sondi (1986), citado por

Shkap *et al.* (2010), estudaram a utilização de lactato de halofuginona no tratamento de casos de febre da Costa Oriental. Nos casos de Teileriose tropical, o seu uso tem sido limitado pela pequena margem que diferencia a dose terapêutica da dose tóxica (Singh *et al.*, 1993, citado por Shkap *et al.*, 2010).

Hoje em dia, é o grupo das naftoquinonas, ao qual pertencem a parvaquona e a buparvaquona (Butalex®), aquele que apresenta as substâncias activas com maior eficácia e mais específicas contra os parasitas do género *Theileria*. Estes fármacos destroem os linfócitos parasitados, pois têm actividade contra as fases merogónicas (esquizontes). A parvaquona é eficaz nas fases iniciais da doença. Se for administrada mais tardiamente, são necessárias várias administrações. A buparvaquona é considerada o fármaco de eleição e, apesar de ser mais eficaz quando usada em estados iniciais da doença (fase dos esquizontes), também é eficaz na fase dos merozoítos (McHardy, 1990, citado por Shkap *et al.*, 2010).

Apesar de serem os fármacos mais utilizados no combate da Teileriose bovina, não conseguem destruir o parasita por completo, ou seja, não conseguem erradicar a infecção por *Theileria* spp.. Assim, o animal deixa de apresentar sinais clínicos (com uma taxa de recuperação dos animais de 80 a 94%), mas permanece num estado de portador (Navarrete *et al.*, 2002; OIE, 2008). Por outro lado, é frequente que os animais que recuperam após o tratamento, permaneçam sem produzir leite/carne durante meses, devido à extensa destruição do sistema imunitário, provocada pela doença. Estes animais tornam-se, também, mais susceptíveis a infecções secundárias (Morrison *et al.*, 2007).

O preço elevado destes produtos é a sua maior desvantagem, tornando-os inacessíveis aos pequenos produtores, principalmente os dos países em desenvolvimento, onde estas doenças têm maior prevalência e causam maiores danos (Shkap *et al.*, 2010). Por outro lado, têm sido reportados casos de insucesso com a utilização destes fármacos e foram descobertas, recentemente, estirpes de *Theileria* resistentes a estes teilericidas (Morrison *et al.*, 2007).

A dose recomendada é de 2,5 mg/kg de peso vivo, no caso da buparvaquona e de 10 mg/kg de peso vivo se se tratar da parvaquona, administradas por via intramuscular, em duas doses, com um intervalo de 48 horas (Radostits *et al.*, 2000).

Saber *et al.* (2008) concluíram que a terapêutica de suporte, no caso de infecções por *T. annulata* em vitelos, deve incluir transfusões sanguíneas e medidas de correcção da função renal e hepática. Contudo, as transfusões sanguíneas entre animais de zonas endémicas devem ser evitadas (CFSPH, 2009).

O Fruvexon® (“Bimeda”, Dublin, Irlanda) é a combinação, mais recentemente reportada, de parvaquona com o diurético furosemida, que alguns autores demonstraram ser efectiva no tratamento da Febre da Costa Oriental, com taxas de cura na ordem dos 90% (Mbwambo, Sudi, Mkonui & Mfinanga, 2002, citado por Shkap *et al.* 2010; Musoke *et al.*, 2004). Contudo,

Shkap *et al.* (2010) testaram a eficácia de Fruvexon® contra a infecção experimental por *T. annulata* e observaram que o fármaco não curou nem reduziu a infecção. Assim sendo, a buparvaquona continua a ser o fármaco de eleição, mesmo quando administrado nas últimas fases da doença.

Parece importante realçar que, em alguns países, há um número reduzido de fármacos registados e permitidos no tratamento da Teileriose (Almería *et al.*, 2009).

Em Portugal, na lista de Medicamentos de Uso Veterinário para hemoparasitoses em bovinos (DGV, 2008) encontram-se alguns produtos usados na terapêutica de combate à Anaplasmose e à Babesiose, mas nenhum é indicado, especificamente, para o tratamento de animais com Teileriose.

Por todas estas razões e também pelo facto de poderem vir a surgir resistências à buparvaquona, torna-se urgente a criação de alternativas no tratamento da Teileriose.

Os “relict plastid” (ou apicoplast), encontrados na maioria dos microorganismos do Filo APICOMPLEXA, podem constituir um novo potencial no combate a *Theileria* spp. (Lizundia, Werling, Langsley & Ralph, 2009). Os inibidores da função dos “apicoplast” inibem a proliferação dos linfócitos, induzida pelos parasitas do género *Theileria*, mas os seus modos de acção não são completamente conhecidos. A ciprofloxacina inibe o crescimento dos linfócitos B infectados por *Theileria* spp. e não tem qualquer efeito sobre os linfócitos não infectados. O fenoxaprop, o triclosan (inibidores da síntese de ácidos gordos) e a rifampicina (inibidor da transcrição bacteriana) inibem a proliferação de linfócitos infectados, mas este efeito não se distingue da sua acção directa sobre a proliferação das células B (Lizundia *et al.*, 2009). O estudo efectuado por Lizundia *et al.* (2009) visa a utilização destes agentes, impedindo a formação de merozoítos de *Theileria* spp. e a invasão de novas células hospedeiras.

Outra alternativa ao uso da parvaquona e da buparvaquona é o extracto de *Peganum harmala*, uma planta medicinal rica em alcalóides, originária da Ásia central. Como se trata de um produto natural, não fica retido nos múculos dos bovinos, como a parvaquona e a buparvaquona, que, por não serem facilmente eliminadas, podem constituir um perigo para a Saúde Pública, se o leite ou a carne de animais tratados forem consumidos pelo Homem (McHardy *et al.*, 1985, citado por Mirzaei, 2007). Mirzaei (2007) estudou a actividade de *Peganum harmala* no tratamento de bovinos infectados por *T. annulata* e verificou que esta planta tem efeitos terapêuticos sobre estes animais. Os bovinos tratados foram considerados “curados” quando a temperatura corporal voltou a atingir valores normais e não foram detectados esquizontes durante três dias consecutivos. A taxa de recuperação dos bovinos infectados foi de 78%. Apesar de, neste estudo, não terem sido administrados outros produtos, reconhece-se a importância de um tratamento de suporte, em paralelo com o efectuado, para diminuir as lesões hepáticas e renais, produzidas, principalmente, pelo metabolismo dos parasitas. O mecanismo pelo qual o extracto de *Peganum harmala* actua

sobre *T. annulata* ainda não é conhecido, mas reconhece-se a diversidade de compostos alcalóides encontrados nesta planta. Pensa-se que o alcalóide presente neste extracto, com maior actividade e efectivo contra *T. annulata*, é a harmalina (Mirzaei, 2007).

11. Controlo

Um dos tipos de controlo exercido no combate à Teileriose baseia-se na profilaxia sanitária. Como se trata de uma doença transmitida por ixodídeos, normalmente, é controlada através do uso de acaricidas. Contudo, este método tem desvantagens: os acaricidas são caros, causam danos ambientais e ao longo do tempo os ixodídeos podem desenvolver resistências a estes produtos. Assim, ao utilizarmos acaricidas a longo prazo estaremos a seleccionar as populações de carraças resistentes (de la Fuente & Kocan, 2006, citado por Almería *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2007).

Deve ser efectuado, o manejo simultâneo das pastagens (como a rotação das mesmas), de modo a assegurar que estas se encontram livres de infestações por carraças. A limpeza e desinfecção dos locais, por si só, não são medidas efectivas na prevenção da transmissão da Teileriose. Devido às falhas no controlo pelos métodos descritos, existe necessidade de desenvolvimento de vacinas contra estas doenças. As vacinas contra ixodídeos, reduzem a infestação por estes parasitas, diminuem a frequência de uso de acaricidas e diminuem a transmissão de agentes por aqueles (de la Fuente *et al.*, 2007, citado por Almería *et al.*, 2009).

Para além do controlo dos vectores, a profilaxia passa também pelo controlo dos agentes. A profilaxia médica, para além do uso de fármacos (mencionados no capítulo anterior), assenta no uso de vacinas vivas atenuadas ou vacinas recombinantes (OIE, 2008). Em áreas onde o risco de transmissão da doença é elevado e em grandes explorações, a vacinação é a estratégia com melhor relação custo-benefício (Muraguri *et al.*, 1998, citado por Lizundia *et al.*, 2009).

Têm sido desenvolvidas vacinas vivas atenuadas eficazes contra *T. annulata*, a partir de linhas celulares infectadas por esquizontes, isoladas de bovinos infectados e mantidas numa cultura *in vitro* (OIE, 2008).

Por sua vez, a vacinação contra *T. parva* é baseada num método controlado de infecção e tratamento, pois não é possível produzir uma vacina atenuada para *T. parva*. Uma razão para tal é que os esquizontes de *T. annulata* têm tropismo para fagócitos (fácil entrada e consequente imunização), enquanto os esquizontes de *T. parva* utilizam uma via de entrada que não passa pela activação de células fagocíticas (OIE, 2008). Por outro lado, Oura *et al.* (2007) e McKeever (2007) confirmaram que ao administrar-se uma vacina viva contra *T. parva* estabelece-se um estado de portador nos animais vacinados e os alelos associados com as estirpes vacinais tornam-se acessíveis para a população de ixodídeos, podendo

emergir nos bovinos não vacinados da mesma exploração ou de explorações contíguas. Assim sendo, os bovinos são inoculados, por via subcutânea, com uma dose de esporozoítos (ou com macerados de ixodídeos, contendo esporozoítos) provenientes de um ixodídeo e tratados simultaneamente com uma tetraciclina de longa acção (OIE, 2008). A clortetraciclina e a oxitetraciclina são utilizadas no tratamento, após este método de imunização por infecção controlada. Também são utilizados teilericidas específicos, como a parvaquona e a buparvaquona (Navarrete *et al.*, 2002). Assim, ocorre uma reacção moderada ou inaparente de Febre da Costa Oriental, seguida de recuperação, sendo que o animal permanece imune a formas homólogas, normalmente, até ao resto da vida (OIE, 2008).

A necessidade de um elevado nível de controlo de qualidade, a dependência de uma cadeia de refrigeração para a distribuição de vacinas, o estabelecimento de estados de portador e a necessidade de vacinar com estirpes derivadas das locais (para não introduzir novas estirpes, distintas das autóctones) são algumas das limitações deste método de controlo. Para além destes factores, tem sido demonstrado que o estado de portador, induzido pelas vacinas vivas, são um custo adicional na produtividade do animal. (Navarrete *et al.*, 2002; Morrison *et al.*, 2007; OIE, 2008; CSPH, 2009). Estas limitações realçam a necessidade de desenvolvimento de métodos de controlo mais efectivos e sustentáveis.

Têm vindo a ser desenvolvidas técnicas que evitam a administração de parasitas vivos, como é o caso das vacinas recombinantes. A utilização de proteínas purificadas (presentes na superfície dos esporozoítos, por exemplo) ou anticorpos monoclonais anti-esporozoítos são duas formas de produção deste tipo de vacinas (Navarrete *et al.*, 2002). Têm sido desenvolvidas subunidades experimentais contra a Febre da Costa Oriental, que contêm antigénios dos estados de esporozoítos (como a proteína p67) ou de esquizontes.

Hoje em dia, as investigações são feitas no sentido de analisar a interacção entre parasita e hospedeiro e compreender a forma como o parasita modula as funções do hospedeiro para seu próprio benefício (Jensen *et al.*, 2009). A informação acerca do genoma das diferentes espécies de *Theileria*, pode ajudar na interpretação da interrelação complexa que ocorre entre hospedeiro, carraça-vector e o parasita. Estes conhecimentos podem ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias de controlo da Teileriose bovina. Desde a sequenciação completa do genoma de *Theileria annulata*, que têm surgido progressos no que diz respeito à criação de vacinas recombinantes, constituídas por subunidades antigénicas (Morrison *et al.*, 2007).

A realização de estudos epidemiológicos (como modelos de transmissão da doença) é importante para determinar o impacto das medidas de controlo implementadas e estabelecer um modo de intervenção, com base na prevalência da doença em regiões endémicas e na avaliação dos custos. Nesse sentido, deve ser efectuada a caracterização dos factores ambientais que influenciam o desenvolvimento do vector, a caracterização dos

hemoparasitas existentes no meio (através de estudos de biologia molecular), bem como a determinação das zonas endémicas. Deste modo, podem ser implementados programas de controlo específicos e apropriados a cada caso, assentes em estratégias que combinem os métodos de controlo dos vectores, com a vacinação (Morrison *et al.*, 2007; OIE, 2008).

Através do “Wellcome Trust Project for Tropical Theileriosis”, pretende-se melhorar o conhecimento acerca da epidemiologia da Teileriose tropical e formular modelos matemáticos para prever o impacto que as medidas de controlo provocam. Assim, este projecto tem como objectivo o desenvolvimento de novas medidas de controlo, através do desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido e de testes que permitam identificar os parasitas resistentes à buparvaquona. Visa, também, o aperfeiçoamento de técnicas para rápida selecção de linhas celulares atenuadas e a identificação de antigénios para a criação de novas vacinas. Desta forma, poder-se-ão implementar programas de controlo mais efectivos e económicos (Morrison *et al.*, 2007).

III. TEILERIOSE EM BOVINOS DE CARNE NA REGIÃO DO RIBATEJO

1. Introdução

Este trabalho pretendeu avaliar a presença de Teileriose em bovinos de aptidão “carne” numa exploração da região do Ribatejo, no concelho de Benavente. A escolha do tema prendeu-se com o facto de, apesar do Ribatejo ser considerado uma zona endémica, existirem poucos estudos sobre a prevalência desta hemoparasitose em Portugal e por ter surgido, no final do mês de Setembro do ano 2009, na exploração em causa, um quadro agudo de Teileriose, em dois vitelos com cerca de dois meses de idade. A doença caracterizou-se por aparecimento súbito e quadros clínico e lesional exuberantes. Em Maio do ano seguinte, na mesma exploração, surgiu um caso semelhante, num vitelo com mês e meio a dois meses de idade.

Estes três animais apresentavam sinais clínicos comuns e lesões idênticas: anorexia, apatia, ataxia, mucosas anémicas/ictéricas, petéquias nas mucosas oral, nasal e lingual e nos pavilhões auriculares. Os linfonodos submandibulares e pré-escapulares apresentavam-se hipertrofiados e detectou-se a presença de nódulos cutâneos (Figura 9-a) e subcutâneos, disseminados por todo o corpo. Por vezes, os nódulos eram acompanhados de sufusões hemorrágicas. Estes animais estavam infestados por ixodídeos.

Num dos casos, a doença foi fatal e o cadáver foi necropsiado. Os dados necrópsicos revelaram a presença de petéquias nas serosas, principalmente no peritoneu. Também se encontraram lesões no omento, no mesentério e na mucosa intestinal, com zonas hemorrágicas, com edema e conteúdo sanguinolento (Figura 9-c).

Figura 9 – Aspectos lesionais observados durante a necrópsia de vitelo (a; b; c) (originais)

a) Nódulo cutâneo



b) Linfonodo pré-escapular hemorrágico



c) Cavidade abdominal com lesões hemorrágicas a nível do mesentério e intestino delgado



Durante a necrópsia, foram colhidos fragmentos de pele e de tecido subcutâneo com lesões. Foi, também, colhido sangue do vitelo vivo. Estas amostras foram devidamente acondicionadas e enviadas para o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV). O resultado do exame histopatológico foi o seguinte:

“Pele – infiltração por células mononucleadas muito intensa na derme superficial, constituindo uma faixa espessa imediatamente abaixo da epiderme, nomeadamente entre os anexos da pele; era pouco intensa na derme profunda, onde havia apenas alguns aglomerados celulares e voltava a ser muito intensa ao nível do tecido muscular esquelético na profundidade; as células eram predominantemente macrófagos e linfócitos, assumindo estes, por vezes, um aspecto homogéneo, assemelhando-se a uma proliferação celular do tipo tumoral; numerosas imagens de necrose celular com acumulação de detritos nucleares. Existência de hemorragias dispersas, assim como extensas acumulações de fibrina, sobretudo no tecido muscular.

As imagens microscópicas observadas, associadas à história clínica, permitem suspeitar de Teileriose, que assume, nos animais jovens, uma forma particularmente exuberante, assemelhando-se a um processo tumoral”.

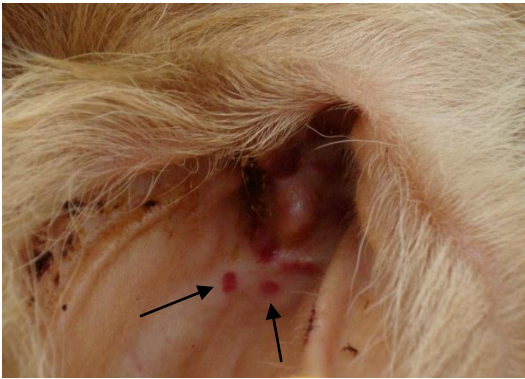
O exame parasitológico do material enviado, através da aplicação da técnica PCR-RLB, permitiu detectar a presença de *Theileria annulata*. Foi também efectuado um teste de cELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Anaplasma*, sendo o resultado positivo.

A um dos vitelos (o caso clínico de Maio de 2010), foi colhido sangue, acondicionado em tubo com EDTA e, no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV, foi efectuado um esfregaço sanguíneo, que depois de corado pelo método de Giemsa, foi observado ao microscópio óptico. Foram detectadas formas parasitárias dentro dos eritrócitos, compatíveis com merozoítos de *Theileria* spp..

A terapêutica instituída, pelo Médico Veterinário assistente da exploração, foi de suporte e comum a ambos os casos, baseando-se em fluidoterapia, oxitetraciclina, ivermectina, dipropionato de imidocarb (Imizol®), protectores hepáticos, vitamina B12 e minerais.

Figura 10 - Petéquias no pavilhão auricular (a) e na mucosa oral e lingual (b) de um vitelo, numa exploração do Alentejo (imagens gentilmente cedidas por M. Centeno)

(a)



(b)



2. Objectivos

Com base no atrás exposto, os objectivos deste trabalho foram:

- a) Avaliar a presença de *Theileria* spp. nos animais da exploração em estudo, através da observação de esfregaços sanguíneos;
- b) Estabelecer níveis de infecção para os hemoparasitas observados;
- c) Identificar (até ao género) uma amostra de ixodídeos, recolhidos aleatoriamente da população em estudo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Localização da exploração

A exploração em estudo localiza-se no Distrito de Santarém, Concelho de Benavente, Freguesia de Santo Estêvão. Tem uma área de 140 hectares (ha), com localização numa zona de charneca.

Figura 11 – Concelho de Benavente, localizado no Distrito de Santarém

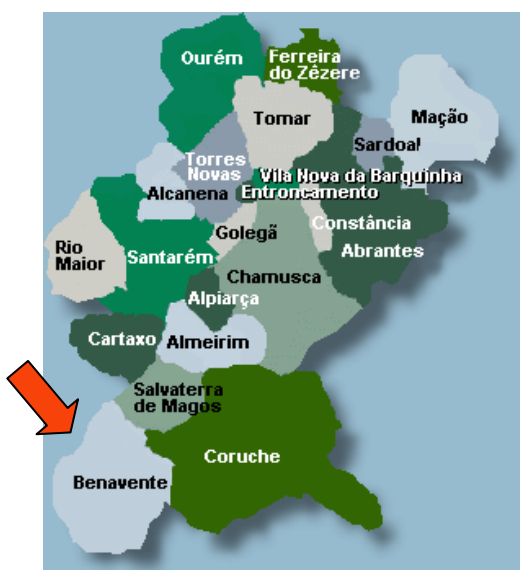


Figura 12 – Freguesia de Santo Estêvão, localizada no Concelho de Benavente



(Fonte: http://www.districtosdeportugal.com/main_santarem/benavente.htm)

3.1.1. Caracterização edafo-climática da região

A freguesia de Santo Estêvão está integrada, na denominada “região alentejana” do Concelho de Benavente, a charneca, com localização na margem direita do Rio Almansor ou Ribeira de Santo Estêvão. Esta é a freguesia do concelho de Benavente, cuja população mais depende da agricultura (27% da população).

O território do concelho de Benavente situa-se no domínio ecológico sub-mediterrânico, numa zona de mosaico de montado e campina e de terrenos irrigados, os aluviões. Assim sendo, a flora predominante nesta zona pode caracterizar-se por:

- Montados de Quercíneas – são árvores do género *Quercus* que podem aparecer combinadas com ou sem vegetação arbustiva, sob a forma de pastagem com um valor florístico reduzido. Estas formações compõem a maior parte da mancha florestal do concelho e sustentam um património cinegético muito elevado.
- Zonas de Pinhal Manso – estas são, normalmente, zonas acompanhadas de sobreiros e do sub-bosque, levando à presença de características de transição.
- Vales Aluvionares – neste caso, o rio Almansor ou Ribeira de Santo Estevão interrompe a secura característica dos montados. Estes vales constituem as zonas de maior diversidade biológica.

Relativamente às características climáticas, podemos considerar que os valores médios mensais da temperatura do ar variam de forma regular ao longo do ano, com a temperatura mínima a registar-se, normalmente, em Janeiro e a máxima em Agosto. A temperatura média anual é próxima dos 17 °C. Os meses de Dezembro e Janeiro são aqueles em que se verifica uma maior precipitação, sendo que a média anual situa-se entre os 600 e os 700 mm (Plano Director Municipal de Benavente, 2007).

O clima desta região é, assim, considerado como continental atenuado, com as seguintes características: temperado quanto à temperatura média anual, moderado na amplitude média da variação anual, húmido relativamente à humidade relativa do ar e moderadamente chuvoso quanto à precipitação (Reis & Gonçalves, 1981; Medeiros, 2000, citados por Madeira de Carvalho, 2001).

Figura 13 - Aspecto da exploração em estudo (a e b) (originais)

(a)



(b)



3.2. Caracterização da população estudada

A exploração em causa dedica-se à produção de bovinos de carne, em regime extensivo. O efectivo bovino total da exploração era de 167 animais, (dados do SNIRA em 15 de Junho de 2010), dos quais 133 fêmeas e 34 machos (incluindo os/as novilhos/as de cria e acabamento, as fêmeas e os machos reprodutores). O efectivo era constituído por animais “Cruzados de carne”. A única raça de origem conhecida era a Limousine, pois um dos machos reprodutores da exploração tinha registo genealógico nesta raça.

A maioria dos animais reprodutores deste efectivo (50 animais) tinham mais de 10 anos de idade, seguida de animais com idades compreendidas entre os 7 e os 9 anos de idade (39 animais) e foram agrupados em grupos etários de acordo com a Tabela 5. Assim sendo, o número de fêmeas reprodutoras era de 95, existindo dois machos reprodutores, perfazendo um total de 97 animais para a reprodução. Neste efectivo, existiam 28 animais nascidos no ano 2009 e 42 nascidos em 2010.

Tabela 5 - Idades e respectivos grupos etários, por número de animais reprodutores

Idade (anos)	Grupos etários	Nº animais
4-6	1	7
7-9	2	39
10-12	3	25
13-15	4	22
16-20	5	3

A alimentação destes animais consistiu, basicamente, no pastoreio dos recursos naturais da exploração, ao longo do ano. Na época do ano em causa (Junho de 2010), a composição florística, característica de um ecossistema tipo Charneca, foi escassa, devido ao Verão quente e seco, característico desta região. No período que decorreu de Agosto a Fevereiro do ano seguinte, foi-lhes fornecida palha de trigo.

Os animais foram submetidos aos programas sanitários anuais, controlados e executados pelo ADS do Baixo Tejo, que englobam as intervenções já mencionadas anteriormente.

Em concreto, esta exploração atingiu e mantém a classificação sanitária de T3 (oficialmente indemne de Tuberculose), B4 (oficialmente indemne de Brucelose) e L4 (oficialmente indemne de Leucose Enzoótica Bovina) e isenta de PPCB. No que diz respeito a planos profilácticos, os animais são vacinados contra Clostridioses, com a vacina multivalente Covexin 8®, e desparasitados com Ivomec F®, um produto que combina a Ivermectina com o Clorsulon. Ambas as intervenções são efectuadas anualmente.

3.2.1. Amostragem

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de sangue periférico de 112 animais, dos quais 95 fêmeas e um macho adultos. Estes 96 animais são aqueles, cujos grupos etários foram apresentados anteriormente, na Tabela 5. Foram, também, efectuadas colheitas de sangue a 16 animais, do total de 70 nascidos nos anos de 2009 e 2010.

Os 16 vitelos, em estudo, apresentavam idades compreendidas entre os 2 e os 12 meses e foram agrupados em grupos etários, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Idades e respectivos grupos etários, por número de vitelos

Idade (meses)	Grupos etários	Nº animais
0 - 3	1	1
$> 3 \leq 6$	2	2
$> 6 \leq 9$	3	2
$> 9 \leq 12$	4	11

Estes animais, seleccionados aleatoriamente, constituíram uma amostra representativa do efectivo, uma vez que foram intervencionados os 96 animais com idade igual ou superior a 4 anos (um dos dois machos do efectivo não fez parte dos animais estudados, por questões de manejo). A amostra de 16 animais, nascidos nos anos de 2009 e 2010, aos quais foram recolhidas amostras, constituiu 23% do total de 70 animais nascidos nestes dois anos.

Por outro lado, esta selecção prende-se com questões de manejo, uma vez que as amostras de sangue para o diagnóstico de hemoparasitoses foram colhidas no mesmo momento em que os animais foram sujeitos ao programa de saneamento anual, efectuado pela Brigada nº 1 do ADS do Baixo Tejo.

Foram também efectuadas recolhas de ixodídeos a 20% (22/112) dos animais estudados (incluindo jovens e adultos), dos quais quatro são jovens (4/16, isto é, 25% da amostra total de vitelos).

Dado o ritmo de trabalho durante o saneamento e a quantidade de animais incluídos neste estudo, não foram efectuados exames clínicos aos mesmos, embora tenha sido detectado um animal que se encontrava prostrado, emaciado, com as mucosas ligeiramente anémicas e com hipertrofia dos linfonodos mandibulares. Apresentava também um marcado edema submandibular e secreção lacrimal (Figura 14).

Figura 14 - Vaca com edema submandibular evidente (original)



3.3. Colheita e conservação de amostras

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção da veia da cauda, recolhidas em tubos individuais com EDTA (Normax® K3E 2,5mL) e acondicionadas à temperatura de refrigeração (cerca de 4° C). A cada amostra foi atribuído um número de série, correspondente a cada animal, para facilitar a identificação durante este estudo. De seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV, UTL, onde foram mantidas no frigorífico. No dia seguinte, foram realizados esfregaços sanguíneos das mesmas, em duplicado para cada amostra.

Quanto aos ixodídeos, foram extraídos, manualmente, da região do úbere e das zonas perianal, inguinal e escrotal dos animais. A extracção foi efectuada, rodando o exemplar 180 graus e puxando cuidadosamente para evitar que as peças bucais ficassem presas na pele do hospedeiro. De seguida, foram colocados em frascos de plástico, contendo álcool a 70°, devidamente identificados com o número de série, atribuído a cada animal e a zona do corpo de onde foram recolhidos os ectoparasitas.

3.4. Processamento das amostras

3.4.1. Execução, coloração e observação dos esfregaços sanguíneos

No presente trabalho, recorreu-se à realização de esfregaços sanguíneos, segundo a técnica de escorregamento total. De seguida, procedeu-se à coloração pelo método de Giemsa, para tal, seguiram-se os seguintes passos:

- 1) Após os esfregaços estarem completamente secos, cobrem-se com metanol, deixando fixar durante cerca de um minuto;
- 2) Diluição do corante Giemsa em água destilada neutra, na proporção de 1/10 mL;
- 3) Cobrir as lâminas com a solução Giemsa, deixando actuar 15-20 minutos;
- 4) Lavar cada lâmina com água da torneira e deixar secar em posição vertical;
- 5) Observação das preparações microscópicas, numa ampliação de x 1000 (ocular de x10 e objectiva de x100) com o auxílio de óleo de imersão.

Estas observações foram efectuadas com o microscópio óptico Olympus® “CX31” do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV. Foram obtidas fotografias com a câmara Olympus® “DP10”, acoplada ao microscópio Olympus® “BX50”.

Inicialmente, foi estipulado que, por cada preparação, seriam observados 10 campos para inferir acerca da positividade/negatividade de cada animal para os parasitas dos géneros *Theileria*, *Anaplasma* e *Babesia*. Depois de confirmada a presença de parasitas, foram estabelecidos níveis de infecção para os géneros observados. Os parâmetros adoptados são apresentados na Tabela 7.

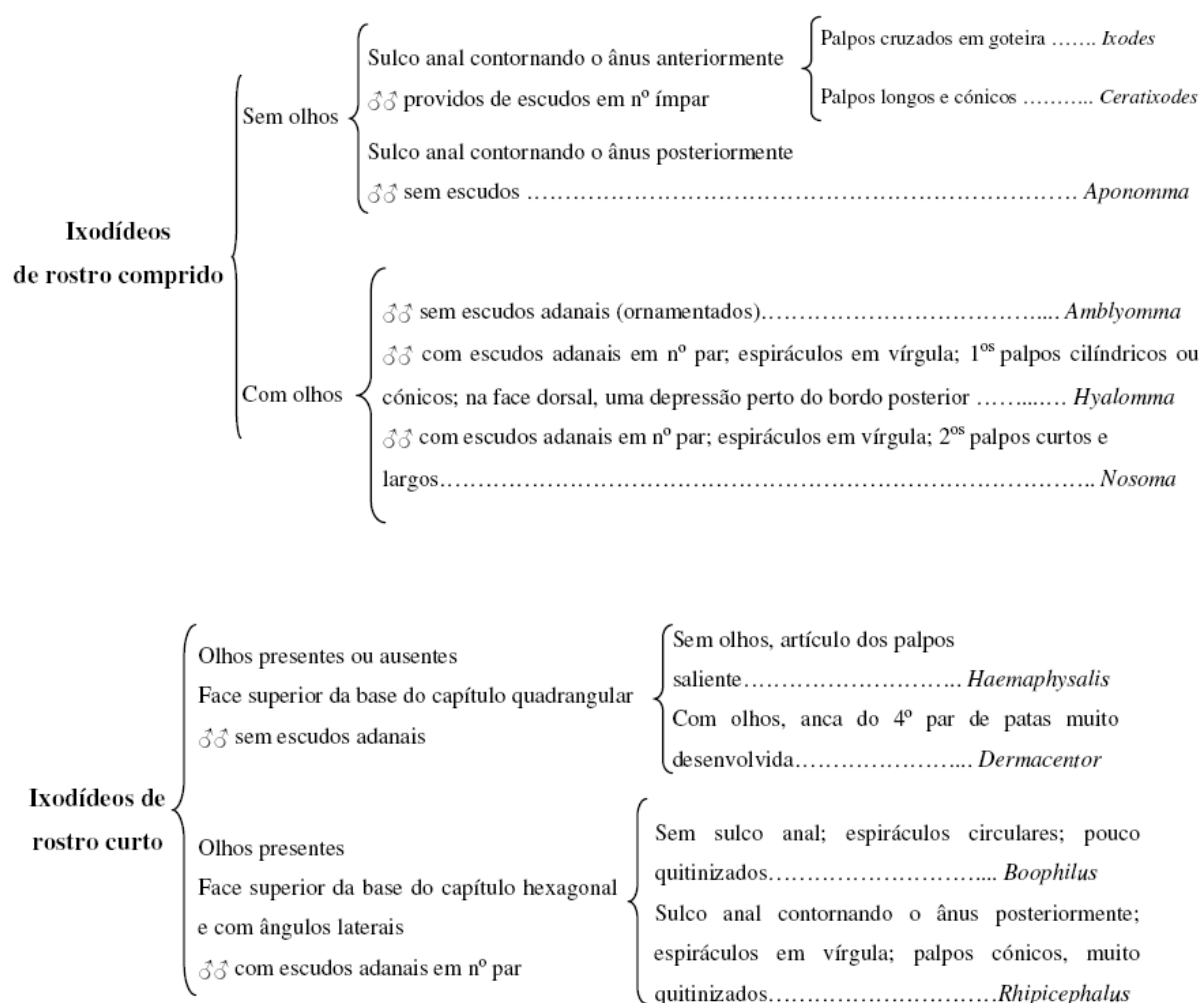
Tabela 7 - Critérios para o estabelecimento dos níveis de infecção relativamente aos géneros

Theileria e *Anaplasma*

Nível 0	0 merozoítos / 10 campos
Nível I	1-10 merozoítos / 10 campos
Nível II	11-20 merozoítos / 10 campos
Nível III	> 20 merozoítos / 10 campos

3.4.2. Identificação dos ixodídeos

Os espécimes foram transportados para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV, UTL. A observação foi efectuada a seco, em microscópio estereoscópico. Cada exemplar foi colocado sobre plasticina, para facilitar a observação das diferentes estruturas morfológicas, separados por sexos e os machos identificados até ao género, segundo a seguinte chave dicotómica (Fazendeiro, 2004):



3.5. Métodos estatísticos

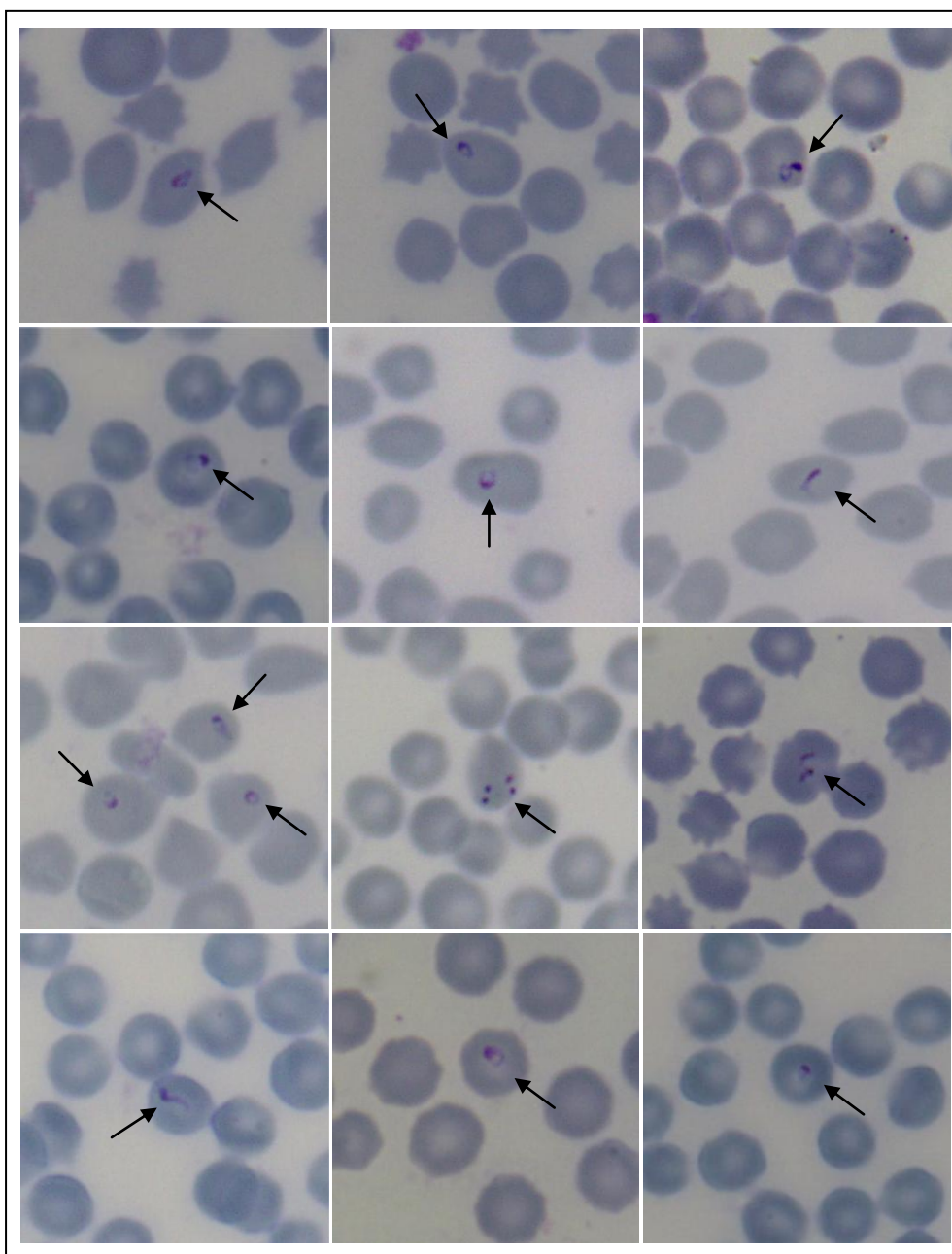
A análise estatística exploratória dos dados e o tratamento gráfico dos mesmos foram realizados no programa “Microsoft Office Excel 2007®”.

4. Resultados

4.1. Esfregaços Sanguíneos

Nos esfregaços sanguíneos, foram observadas formas intraeritrocitárias compatíveis com merozoítos de *Theileria* spp. (Figura 15) e *Anaplasma* spp. (Figura 17), quer nos bovinos reprodutores (tabela 8), quer nos vitelos (tabela 9).

Figura 15 – Diversas formas de merozoítos (setas) de *Theileria* spp. Ampliação x1500 aprox. (Original)



A variabilidade de formas dos merozoítos de *Theileria* spp. está presente na Figura 15. Contudo, as formas de *Theileria* spp. observadas apresentaram, maioritariamente, morfologia em anel. Na Figura 16, podemos observar alguns exemplos de *Anaplasma* spp.. Não foram encontradas formas parasitárias do género *Babesia* nos esfregaços sanguíneos dos animais em estudo.

Figura 16 – Exemplos de *Anaplasma* spp. (setas) Ampliação x1500 aprox. (Original)

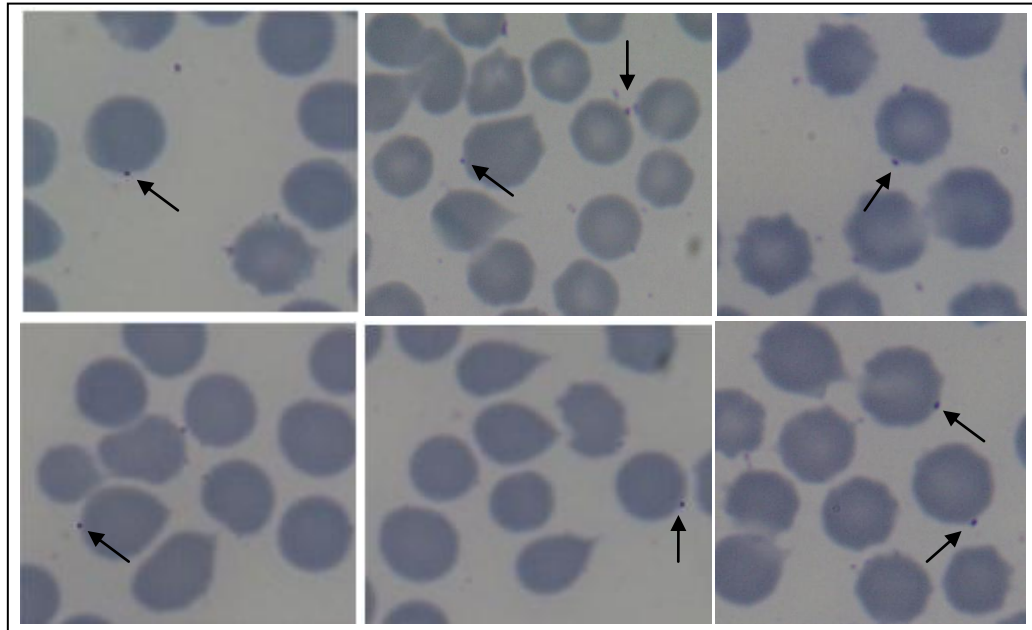


Tabela 8 - Resultados da observação dos esfregaços sanguíneos dos animais reprodutores por níveis de infecção e por parasitas

Número de identificação	Sexo	Grupo etário	Níveis de infecção		
			<i>Theileria</i> spp.	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
1	F	2	I	I	0
2	F	3	I	II	0
3	F	2	I	I	0
4	F	2	I	I	0
5	F	2	I	I	0
6	F	2	I	I	0
7	F	4	I	I	0
8	F	2	I	I	0
9	F	3	I	II	0
10	F	1	I	I	0
11	F	2	I	I	0
12	F	5	I	I	0
13	F	1	I	II	0
14	F	3	II	I	0
15	F	4	I	I	0
16	F	4	II	I	0
17	F	4	I	I	0
18	F	4	I	II	0
19	F	4	I	I	0
20	F	4	I	II	0
21	F	2	I	I	0
22	F	1	I	I	0
23	F	2	I	II	0
24	F	4	I	I	0
25	F	2	I	II	0
26	F	2	I	I	0
27	F	2	I	I	0
28	F	4	I	II	0
29	F	2	II	I	0
30	F	4	I	I	0
31	F	1	I	II	0
32	F	2	I	I	0
33	F	2	I	I	0
34	F	2	II	I	0
35	F	3	I	I	0
36	F	2	I	III	0
37	F	4	I	II	0
38	F	2	I	I	0
39	F	4	I	I	0
40	F	5	I	II	0
41	F	2	I	II	0
42	F	3	I	I	0

Tabela 8 (continuação): Resultados da observação dos esfregaços sanguíneos dos animais reprodutores por níveis de infecção e por parasitas					
Número de identificação	Sexo	Grupo etário	<i>Theileria</i> spp.	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
43	F	4	I	I	0
44	F	3	I	I	0
45	F	3	I	I	0
46	F	1	I	II	0
47	F	2	I	III	0
48	F	2	I	I	0
49	F	3	I	II	0
50	F	2	II	II	0
51	F	2	I	I	0
52	F	4	I	II	0
53	F	2	I	III	0
54	F	2	I	III	0
55	F	4	I	I	0
56	F	2	I	I	0
57	F	3	II	I	0
58	F	3	I	I	0
59	F	4	I	I	0
60	F	2	I	I	0
61	F	3	II	I	0
62	F	2	I	II	0
63	F	2	I	I	0
64	F	2	II	III	0
65	F	3	I	I	0
66	F	4	I	I	0
67	F	2	I	I	0
68	F	3	I	I	0
69	F	3	II	II	0
70	F	3	I	I	0
71	F	3	II	I	0
72	F	3	I	I	0
73	F	3	I	II	0
74	F	2	I	I	0
75	F	4	I	I	0
76	F	3	I	I	0
77	F	4	I	I	0
78	F	2	I	I	0
79	M	1	I	II	0
80	F	3	I	II	0
81	F	5	I	III	0
82	F	3	I	II	0
83	F	3	I	I	0
84	F	4	I	II	0
85	F	4	I	I	0

Tabela 8 (continuação): Resultados da observação dos esfregaços sanguíneos dos animais reprodutores por níveis de infecção e por parasitas					
Número de identificação	Sexo	Grupo etário	<i>Theileria</i> spp.	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
86	F	2	I	II	0
87	F	4	I	II	0
88	F	1	I	III	0
89	F	2	II	I	0
90	F	2	I	II	0
91	F	2	I	II	0
92	F	2	I	III	0
93	F	3	I	III	0
94	F	3	I	II	0
95	F	3	I	I	0
96	F	2	II	II	0

Através da análise da Tabela 8, observa-se que todos os bovinos reprodutores apresentam formas de *Theileria* spp. e de *Anaplasma* spp. nos esfregaços sanguíneos, não existindo nenhum animal classificado com “nível de infecção 0”.

Dos 96 reprodutores, 84 apresentam “nível de infecção I” para a presença de *Theileria* spp., o que corresponde a 87% da população em estudo. Apenas cerca de 13% (12/96) dos animais, apresenta “nível de infecção II”, enquanto o nível III não foi verificado em qualquer dos animais (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 5 - Distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp. nos animais reprodutores (N=96)

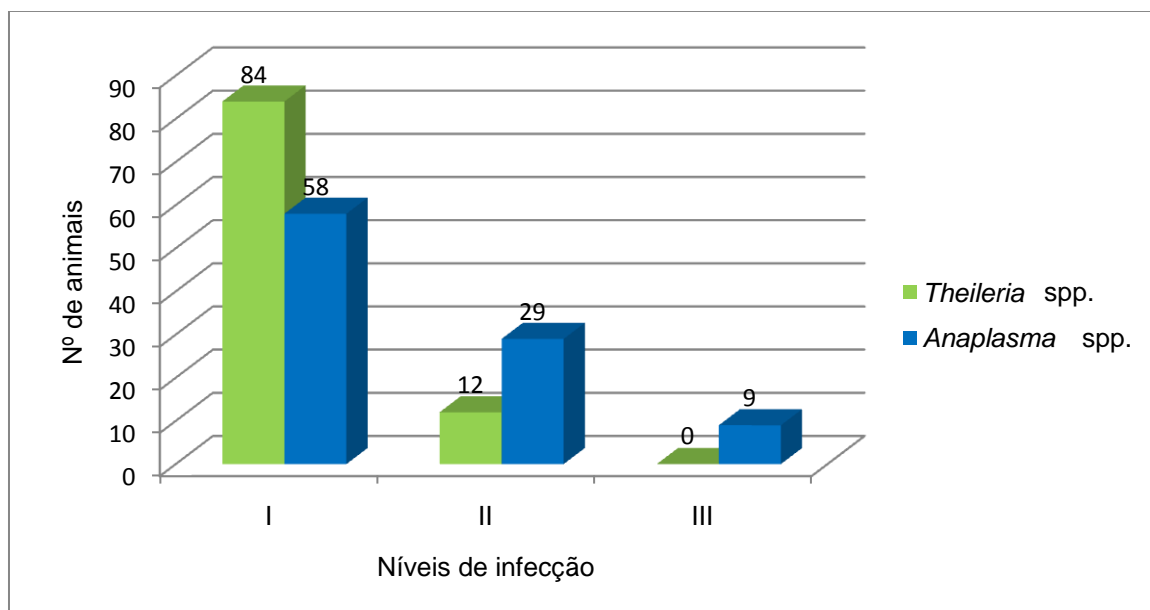
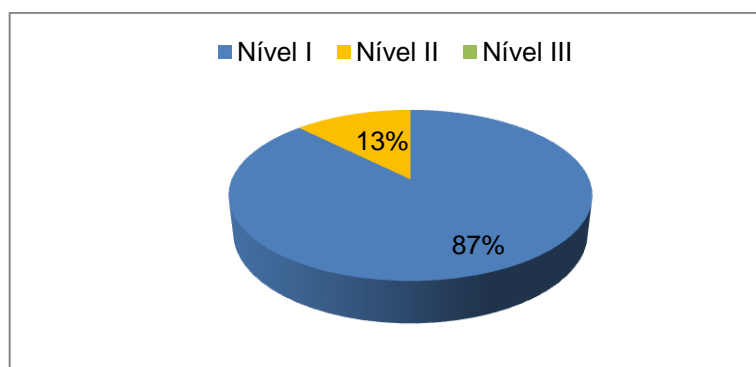
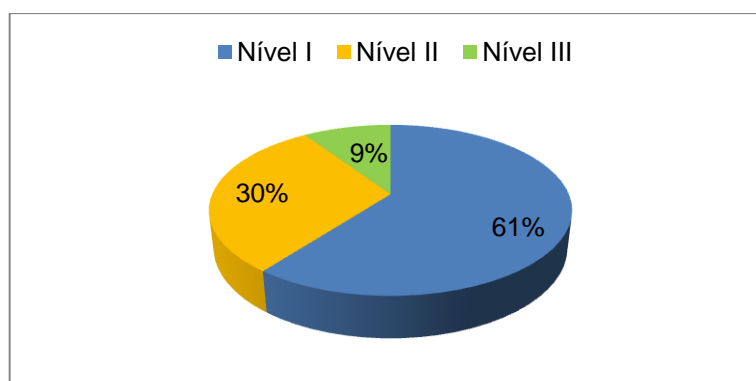


Gráfico 6 - Proporção dos níveis de infecção de *Theileria* spp. nos animais reprodutores (N=96)



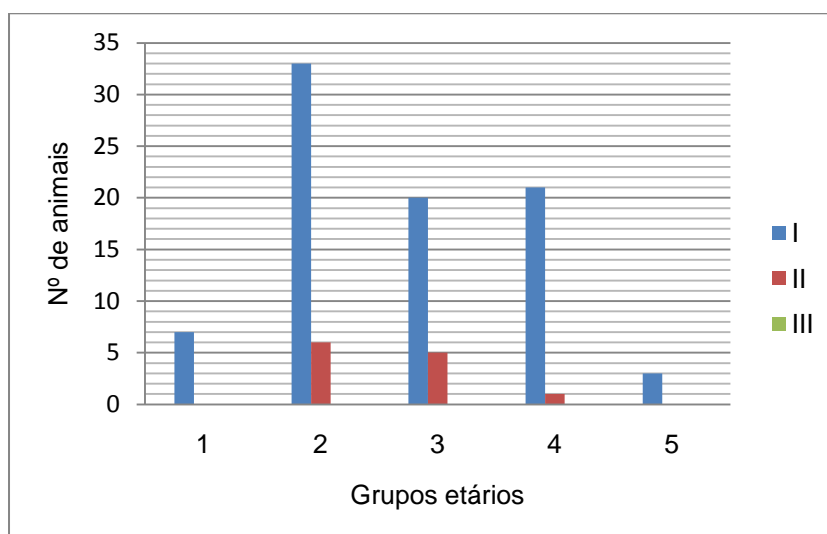
Quanto à infecção por *Anaplasma* spp., mais de metade dos bovinos reprodutores (61%) é classificado com “nível de infecção I”, 30% com “nível de infecção II”, enquanto o nível III é atribuído apenas a 9% da população (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Proporção dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. nos animais reprodutores (N=96)



Relativamente à distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. por grupos etários, no Gráfico 8, observa-se que todos os animais pertencentes ao grupo etário 1, assim como os do grupo 5 estão infectados em nível I. No grupo etário 2, estão incluídos 39 animais, dos quais 33 (85%) apresentam nível de infecção I, enquanto apenas 6 (15%) estão em nível de infecção II. O grupo etário 3 compreende 25 bovinos, sendo que 20 (80%) têm nível de infecção I e 5 (20%) encontram-se em nível II. No grupo etário 4, 95% dos animais (21/22) apresentam nível de infecção I e apenas um animal exibe nível de infecção II. Nenhum bovino destes grupos etários está classificado com nível de infecção III.

Gráfico 8 - Distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. por grupos etários, nos animais reprodutores (N=96)



No que diz respeito à distribuição dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. por grupos etários, nos animais reprodutores, através da observação do Gráfico 9, pode observar-se que dos sete animais que pertencem ao grupo etário 1, dois apresentam nível I de infecção, quatro com nível II e apenas um animal com nível III. Somente três bovinos fazem parte do grupo etário 5, sendo que cada animal distribui-se por um dos três níveis de infecção.

Tal como observado para o género *Theileria*, a distribuição dos níveis de infecção I e II de *Anaplasma* spp. tem um comportamento idêntico nos grupos etários restantes, sendo que no grupo 2, 62% dos animais (24/39) apresenta o 1º nível de infecção, seguida do 2º nível com 23% dos animais (9/39). No grupo etário 3, 64% (16/25) estão classificados com nível de infecção I, enquanto 32% (8/25) são classificados com nível II. No grupo etário seguinte, a distribuição é semelhante à do grupo anterior, com menos um animal por cada nível de infecção. Em relação ao nível de infecção III, o grupo etário 2 é o que possui maior número, com 6 animais, enquanto os restantes grupos etários possuem um animal com esta classificação, à excepção do grupo 4, em que nenhum animal exhibe este nível de infecção.

Gráfico 9 - Distribuição dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. por grupos etários, nos animais reprodutores (N=96)

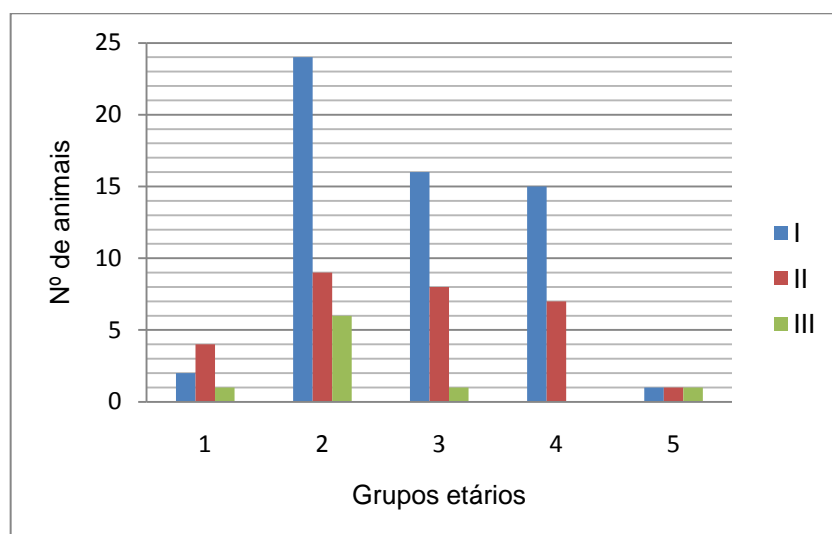


Tabela 9 – Resultados da observação dos esgregaços sanguíneos dos vitelos por níveis de infecção e por parasitas

Número de identificação	Sexo	Grupo etário	Níveis de infecção		
			<i>Theileria</i> spp.	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
1	F	4	II	II	0
2	F	4	I	II	0
3	F	4	II	III	0
4	F	4	III	II	0
5	F	4	III	II	0
6	F	4	III	II	0
7	F	4	III	II	0
8	F	4	I	I	0
9	F	4	II	II	0
10	F	4	II	I	0
11	M	1	I	I	0
12	M	4	I	I	0
13	F	2	I	I	0
14	F	3	II	I	0
15	M	3	I	I	0
16	M	2	III	I	0

O nível de infecção III, de *Theileria* spp., tem maior expressão do que nos animais reprodutores, surgindo em 31% (5/16) dos vitelos. Aos níveis II e III, correspondem iguais percentagens de animais, enquanto o nível de infecção I continua a ser predominante, com 38% dos vitelos (6/16) (Gráficos 10 e 11).

Gráfico 10 - Distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp. em vitelos (N=16)

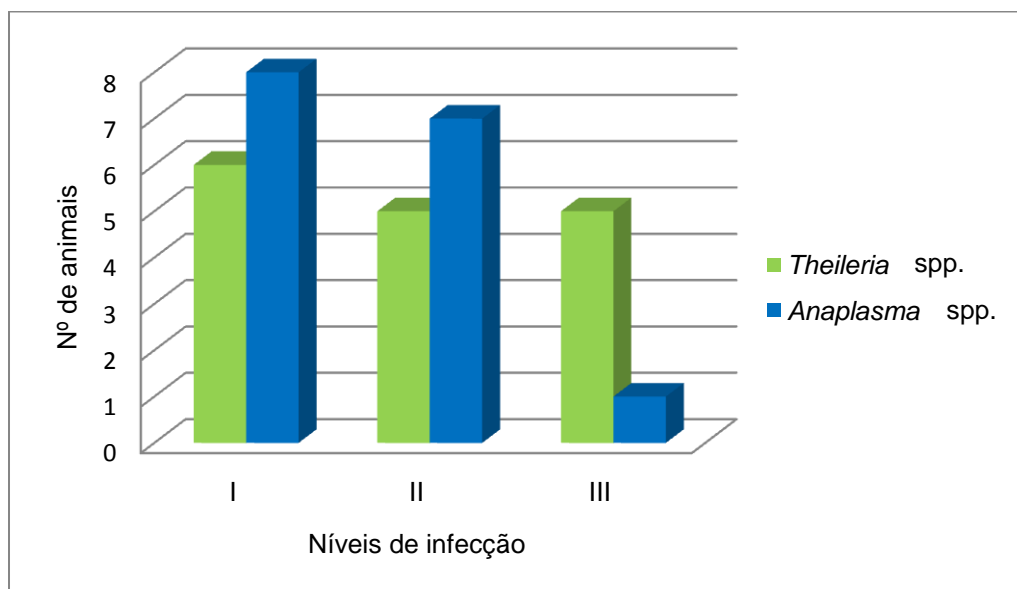
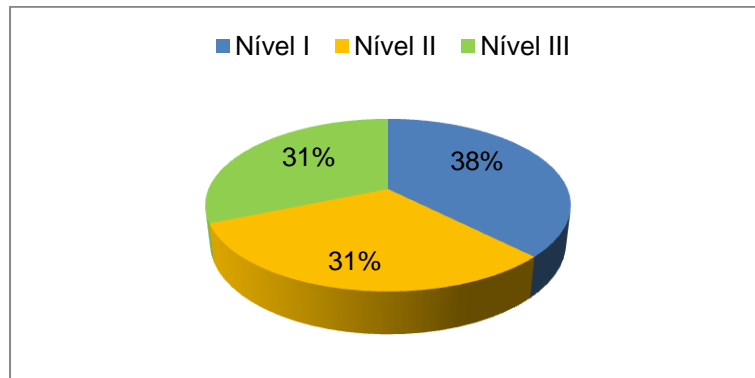
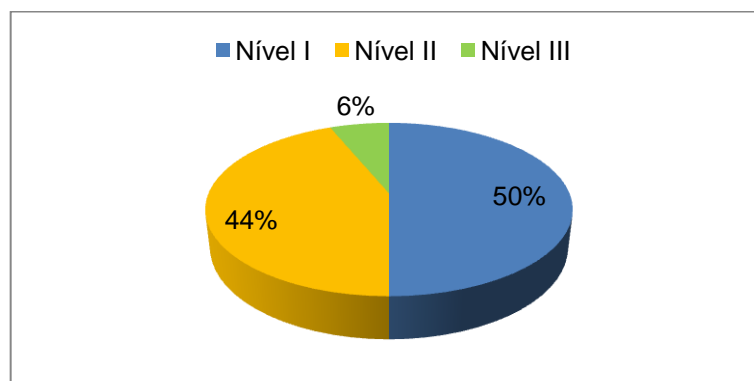


Gráfico 11 - Proporção dos níveis de infecção de *Theileria* spp. nos vitelos (N=16)



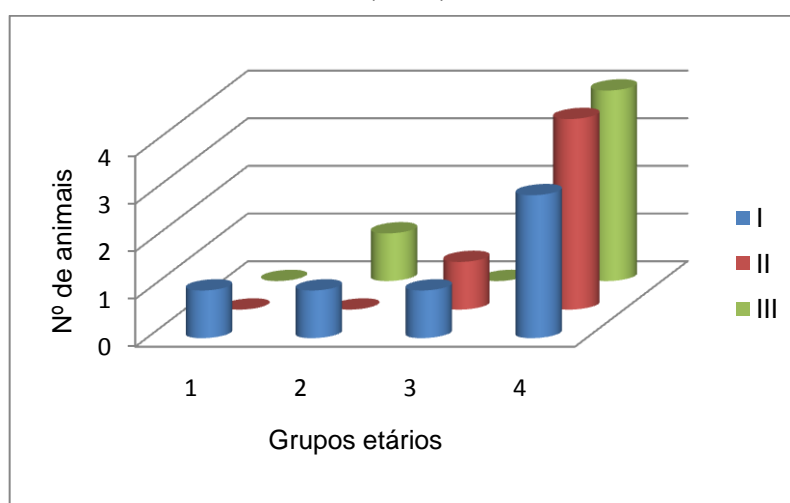
Quanto à infecção por *Anaplasma* spp., 50% (8/16) vitelos encontra-se no nível I, 44% (7/16) apresentam nível de infecção II e apenas 6% (1/16) nível III (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Proporção dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. nos vitelos (N=16)



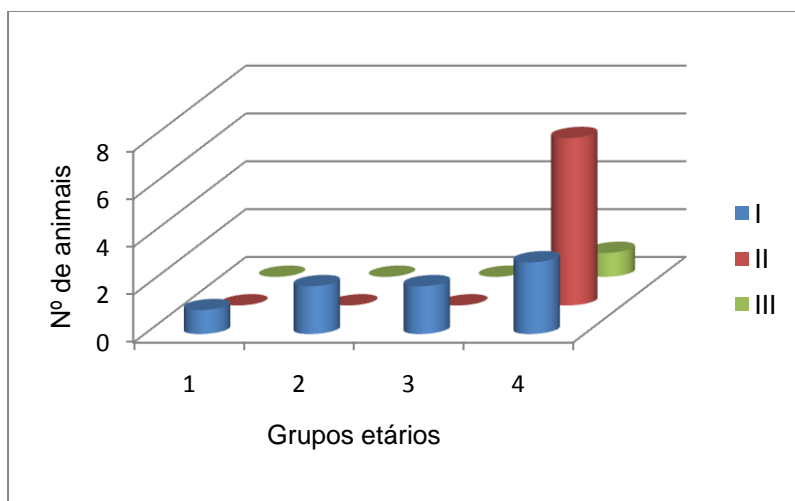
Nos vitelos, a observação da distribuição de *Theileria* spp. por grupos etários, permite-nos concluir que o único animal com idade inferior ou igual a três meses de idade (grupo etário 1) apresenta nível de infecção I. No grupo etário 2 (animais $> 3 \leq 6$ meses), existem dois animais, sendo que um deles encontra-se infectado por *Theileria* spp. em nível I e o outro em nível III. O grupo 3 (animais $> 6 \leq 9$ meses) inclui, igualmente, dois vitelos, mas neste caso com níveis de infecção I e II. Por último, dos 11 animais pertencentes ao grupo etário 4 (animais $> 9 \leq 12$ meses), observa-se que três apresentam nível de infecção I, quatro exibem nível de infecção II e os restantes quatro encontram-se com nível de infecção III (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. por grupos etários, nos vitelos (N=16)



No que se refere a *Anaplasma* spp., o vitelo do grupo etário 1, encontra-se infectado em nível I. Os dois animais incluídos no grupo etário 2 apresentam nível de infecção I. O mesmo acontece no grupo etário 3. Dos 11 animais pertencentes ao grupo etário 4, três foram classificados com nível de infecção de I, sete animais com nível de infecção II e um animal com nível de infecção III (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Distribuição dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. por grupos etários, nos vitelos (N=16)



4.2. Ixodídeos

Os ixodídeos, recolhidos de alguns dos animais em estudo e identificados segundo a chave dicotômica apresentada no capítulo anterior, pertencem aos géneros *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, sendo que a maioria são do género *Hyalomma* (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição do número de espécimes identificados, por género e sexo

	Nº de machos	Nº de fêmeas	TOTAL
<i>Hyalomma</i> spp.	33	27	60
<i>Rhipicephalus</i> spp.	20	12	32
TOTAL	53	39	92

Figura 17- Macho do género *Hyalomma*
(face dorsal) (original)



Figura 18- Macho do género *Hyalomma*
(face ventral) (original)



Figura 19 - Fêmea do género *Hyalomma*
(face dorsal) (original)



Figura 20 - Fêmea engorgitada do
género *Hyalomma* (face dorsal) (original)



Figura 21- Macho do género *Rhipicephalus* (face dorsal) (original)



Figura 22- Macho do género *Rhipicephalus* (face ventral) (original)



Figura 23- Fêmea do género *Rhipicephalus* (face dorsal) (original)



Figura 24- Fêmea engorgitada do género *Rhipicephalus* (face dorsal) (original)



De um total de 112 animais, apenas quatro não apresentavam ixodídeos visíveis, o que significa que 96% da população em estudo (108 animais) encontrava-se parasitada por este tipo de ectoparasitas.

A maioria dos animais reprodutores apresentava ixodídeos na zona do úbere, enquanto que nos vitelos, era a zona perianal a mais afectada.

5. Discussão

Este trabalho pretendeu avaliar a presença de *Theileria* spp. numa exploração do concelho de Benavente (Figuras 11 e 12), que se localiza na região do Ribatejo.

Neste estudo, o diagnóstico de Teileriose foi efectuado através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos (Figura 15). Através destas observações, foi também possível verificar a existência/ausência de outros dois hemoparasitas comuns em bovinos, pertencentes aos géneros *Anaplasma* e *Babesia*.

A observação microscópica dos esfregaços pode ser considerada subjectiva, na medida em que está sujeita à interpretação do operador, mas foi o meio de diagnóstico escolhido dado os custos envolvidos noutros testes. A técnica utilizada foi suficiente para inferir acerca da positividade/negatividade dos géneros *Theileria*, *Anaplasma* e *Babesia* e para o estabelecimento de níveis de infecção.

Perante os resultados constantes na Tabela 8, observou-se que todos os bovinos incluídos no estudo apresentavam formas de *Theileria* spp. e de *Anaplasma* spp. nos esfregaços sanguíneos (Figuras 15 e 16), não existindo nenhum animal classificado com “nível de infecção 0” para estes géneros. Assim, pode afirmar-se que, no período em estudo, as prevalências foram de 100% para *Theileria* spp. e para *Anaplasma* spp., o que está de acordo com Caeiro (1999), que referiu a região do Ribatejo como sendo endémica. Em nenhum estudo da bibliografia científica nacional e internacional consultada foram observados valores de prevalências tão elevados. Contudo, convém realçar que os bovinos incluídos nesses estudos, na maioria das vezes, não pertenciam todos à mesma exploração, como na presente dissertação. Contrariamente, como se pode observar na Tabela 8, todos os bovinos incluídos neste trabalho encontravam-se em “nível de infecção 0” para *Babesia* spp., o que já não está em concordância com Caeiro (1999), que defendeu que a presença de Babesiose era importante naquela zona.

Todos os animais em estudo estavam infectados por *Theileria* spp. e, simultaneamente, por *Anaplasma* spp., isto é, as infecções eram sempre mistas.

No estudo efectuado por Antunes (2008), nenhum animal apresentava infecção simples por *Theileria* spp., pelo que este género surgiu sempre em infecções mistas, tal como se observou nos bovinos incluídos neste trabalho, apesar dos diferentes géneros associados.

Apesar de terem sido realizados na mesma região e do meio de diagnóstico utilizado ser comum a ambos, os resultados do presente estudo são bastante diferentes dos observados por Antunes (2008), na medida em que naquele trabalho, a prevalência de *Theileria* spp. foi de 27%, enquanto que a agora obtida foi de 100%. Contrariamente, não foi identificado nenhum animal infectado por *Babesia* spp., parasitas mais prevalentes (76%) no estudo efectuado por Antunes (2008).

Num estudo efectuado por Kaya *et al.* (2006), numa zona localizada no Sul da Turquia, que supunham ser endémica, revelou que 2,33% (5/214) dos animais eram positivos para *T. annulata*, por observação de esfregaços sanguíneos ao M.O., enquanto através do teste IFA, a prevalência foi de 11,21% (24/214). Este estudo reflecte a baixa sensibilidade do exame microscópico, face a outros métodos, como é o caso dos serológicos como o IFA. Contudo, neste trabalho, essa limitação não constituiu um problema, face aos resultados obtidos.

Apesar da variabilidade de formas dos merozoítos de *Theileria* spp. observadas nos esfregaços sanguíneos, a maioria apresentava morfologia em anel (Figura 15). Esta forma está descrita como a mais característica e predominante nas infecções por *T. annulata* (Leitão, 1945; Caeiro 1973; Barnett, 1977; Bussierras & Chermette, 1992, citados por Branco, 2009; Navarrete *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2007).

Embora não tenham sido realizados outros meios de diagnóstico para concluir qual a espécie de *Theileria* existente nos animais estudados, pressupõe-se que seja *T. annulata* pela forma em anel de grande parte dos merozoítos intra-eritrocitários e pelo elevado número de ixodídeos do género *Hyalomma* identificados, sendo estes reconhecidos como vectores de *T. annulata*.

Sabe-se, igualmente, que este parasita está presente na vacada, devido a esta espécie ter sido identificada, pelo LNIV, nas amostras de um dos vitelos que surgiu com a forma aguda de Teileriose Tropical, em Setembro de 2009.

Através da interpretação dos resultados obtidos nos Gráficos 5 e 6, relativamente ao género *Theileria* spp., observou-se que do total de bovinos reprodutores estudados, 87% (84/96) apresentam “nível de infecção I”, 13% (12/96) estão em “nível de infecção II”, enquanto o nível III não foi verificado em qualquer dos animais adultos.

Os bovinos incluídos neste estudo (excepto a vaca nº 73) não apresentavam sinais clínicos, o que está em concordância com os baixos níveis de infecção detectados. Com base no número e localização dos merozoítos pode considerar-se que estes animais se encontravam numa fase intermédia da infecção por *Theileria* spp., uma vez que na fase inicial, poderiam ser observados esquizontes nos leucócitos presentes nos esfregaços sanguíneos, enquanto que numa fase final da doença, o número de merozoítos por campo seria muito menor, do que o observado.

Segundo CFSPH (2009), os bovinos adultos são, frequentemente, assintomáticos, pois a infecção é, na maioria das vezes subclínica, levando apenas a diminuições dos índices produtivos. Assim sendo, ao se distribuir os níveis de infecção de *Theileria* spp. por grupos etários, nos animais reprodutores (Gráfico 8), podia esperar-se que o nível I se encontrasse uniformemente distribuído pelos diferentes grupos, pois níveis baixos de parasitémia estão relacionados com infecções subclínicas. Contudo, esta distribuição homogénea não se verifica, pois a distribuição do número de animais por grupos etários é muito heterogénea.

Através da interpretação do gráfico 8, observamos que o número de animais com infecção em nível II, decresce à medida que a idade aumenta, deixando de existir animais com este nível de infecção no grupo etário 5. Isto pode estar relacionado com o facto dos animais se tornarem portadores crónicos assintomáticos, apresentando níveis de parasitémia menores com o avançar da idade. Pela mesma razão, poderia pensar-se que o número de animais em nível I, aumentaria proporcionalmente à idade. Tal não se pode verificar, mais uma vez, pela heterogeneidade do número de animais em cada grupo etário.

O nível de infecção II, está patente nos grupos etários 2 (7 aos 9 anos), 3 (10 aos 12 anos) e 4 (13 aos 15 anos), pelo que não existe nenhum animal do grupo 1 (4 aos 6 anos), nem do grupo 5 (16 aos 20 anos) com infecção neste nível.

Kaya *et al.* (2006) estudaram a prevalência de *T. annulata* em várias províncias da Turquia, em diferentes grupos etários de bovinos, e concluíram, através da aplicação do teste IFA, que as taxas de infecção mais elevadas pertenciam aos grupos de animais com mais de 5 anos de idade. Embora o meio de diagnóstico utilizado não tenha sido o mesmo, no presente estudo, os níveis de infecção II pertencem a animais acima do grupo etário 1, o que está de acordo com o observado por Kaya *et al.* (2006).

O facto de nenhum bovino reprodutor apresentar nível de infecção III, apoia o que foi dito anteriormente, em relação aos animais adultos apresentarem, normalmente, infecção subclínica.

Por outro lado, apesar de a espécie *T. annulata* ser patogénica, sabe-se que os bovinos de raças autóctones de zonas endémicas, normalmente, desenvolvem infecções moderadas ou subclínicas. Para além disso, os animais que tenham manifestado a forma clínica e que recuperaram da infecção tornam-se portadores crónicos assintomáticos (Navarrete *et al.*, 2002).

Os bovinos desta exploração eram “Cruzados de carne”, na sua grande maioria, o que significa que, não se conheciam as raças de origem. Normalmente, este termo utiliza-se quando os animais resultam do cruzamento de uma raça autóctone com uma raça exótica, de aptidão carne, como é o caso da raça Limousine. O único animal desta raça era um dos machos reprodutores da exploração (correspondente ao número 79 da Tabela 8), pelo que alguns dos vitelos nascidos nos anos de 2009 e 2010 eram descendentes dele.

Sabe-se que os bovinos de raças exóticas são mais susceptíveis à Teileriose Tropical, do que os bovinos de raças autóctones, que, normalmente, apresentam sintomatologia menos grave, ou são assintomáticos. Nos países, em que a doença assume carácter endémico, os animais de raças autóctones apresentam, principalmente, a forma sub-aguda da doença e depois de recuperarem, são resistentes à reinfecção, enquanto os bovinos de raças importadas ou resultantes do cruzamento com estas, podem estar sujeitos a taxas de mortalidade elevadas (Preston, 1992, citado por Branco, 2009; Ahmed *et al.*, 2008). As raças que têm origem na espécie *Bos indicus* são mais resistentes à doença do que as

raças com origem em *Bos taurus* (Jensen *et al.*, 2008, citado por Branco, 2010). Segundo Food and Agriculture Organization (2000), as raças de bovinos existentes na Europa são originárias de *Bos taurus*, embora Beja-Pereira *et al.* (2006) indiquem que algumas raças do Sul da Europa resultam de cruzamentos com *Bos indicus*.

Apesar das fêmeas reprodutoras (95 dos animais constantes na Tabela 8) não serem de raças autóctones, possuem genes das mesmas, pois derivam de cruzamentos, e, na sua maioria, nascidas na exploração, inserida numa zona endémica. Logo, o facto de os animais estarem permanentemente em contacto com os vectores e, consequentemente, com os esporozoítos de *Theileria annulata*, permitiu que tivessem desenvolvido infecções subclínicas e assintomáticas.

Devido à ausência de sintomatologia nos bovinos do efectivo (com excepção da vaca nº 73), a espécie *T. buffeli*/*T. orientalis* poderia estar presente nestes animais.

Sabe-se que *T. buffeli*, normalmente, não causa sinais clínicos, e existe em Portugal (Brígido *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2010). Segundo Georges *et al.* (2001), citado por Brígido *et al.* (2004), *T. buffeli*/*T. orientalis* pode ocorrer em associação com *T. annulata*, pelo que ambas as espécies poderiam estar presentes nos bovinos estudados. Como a diferenciação entre espécies não se baseia nas características morfológicas dos merozoítos, mas sim nas características antigénicas, provas de imunidade cruzada, detecção de diferenças na sequência genómica e nos tipos de proteínas que se encontram nos esquizontes (Navarrete *et al.*, 2002), não se pode concluir qual/quais a(s) espécie(s) de *Theileria* existente(s) naqueles animais, através da observação dos esfregaços sanguíneos.

Desta forma, seria de todo o interesse a identificação da(s) espécie(s) de *Theileria* presentes nos 112 animais estudados, recorrendo a estudos moleculares, tal como foi efectuado nos trabalhos de Gomes *et al.* (2010), García-Sanmartín *et al.* (2006), entre outros autores.

Gomes *et al.* (2010) utilizaram meios de diagnóstico como PCR e testes RLB para avaliar a prevalência de hemoparasitas em bovinos dos distritos portugueses de Beja, Évora e Portalegre. Desta forma, conseguiram identificar as espécies *T. annulata* e *T. buffeli/orientalis*, em 35,6% e 15% dos bovinos, respectivamente. Quanto à espécie *B. bigemina* foi identificada em 6,4% dos animais. Apesar de as técnicas de diagnóstico, empregues por aqueles autores, serem muito mais objectivas e sensíveis do que a observação microscópica de esfregaços sanguíneos, as prevalências obtidas neste estudo são bastante superiores. Pode observar-se, ainda, que naquelas zonas do Alentejo, as espécies pertencentes ao género *Theileria* são mais prevalentes do que *Babesia* spp., tal como observado no presente trabalho.

García-Sanmartín *et al.* (2006) ao estudarem a prevalência de *Theileria* spp. em bovinos da região Norte de Espanha observaram formas parasitárias compatíveis com *Theileria* spp. ao M.O., que depois foram identificadas, por RLB. *T. annulata* foi identificada em 8,4% (22/263)

das amostras, enquanto *T. buffeli* foi a espécie mais prevalente (42,6%), encontrada em 112, das 263 amostras. Estes autores recorreram à técnica RLB em paralelo com a observação microscópica, o que também teria sido importante aplicar no presente trabalho. Através do RLB estimou-se 54% de amostras positivas, enquanto apenas 28% foram detectadas por observação de esfregaços sanguíneos ao M.O.. Contudo, no presente estudo, o problema de se subestimar a prevalência através da observação microscópica não se pôs, uma vez que foram detectadas formas parasitárias compatíveis com *Theileria* spp. e com *Anaplasma* spp., em todos os animais (prevalências de 100%).

Em Espanha, García-Sanmartín *et al.* (2006) observaram valores de prevalência de *T. buffeli* (42,6%) muito superiores aos observados, em Portugal, por Brígido *et al.* (2004), que detectaram parasitas pertencentes ao grupo *T. buffeli/T. sergenti/T. orientalis* em 2,6% (3/116) e aos observados por Gomes *et al.* (2010), que detectaram *Theileria buffeli/orientalis* em 15% dos bovinos em estudo, pertencentes à região do Alentejo.

No estudo efectuado por García-Sanmartín *et al.* (2006), os animais correspondentes às amostras positivas para *T. buffeli* apresentavam hemogramas com parâmetros normais, reforçando o facto de que, geralmente, esta é uma espécie não-patogénica. Apesar disto, não se exclui a hipótese daquela espécie poder causar infecções subclínicas e causar diminuições na produção. São necessários mais estudos, para saber se, de facto, a espécie *T. buffeli* não tem efeitos nos índices produtivos dos bovinos (García-Sanmartín *et al.* 2006). Estas razões reforçam a necessidade de identificação da(s) espécie(s) de *Theileria*, existentes nos animais incluídos neste trabalho.

Almería *et al.* (2009) estudaram a prevalência das infecções por hemoparasitas em bovinos na ilha Minorca (ilhas Baleares, Espanha), recorrendo à técnica RLB. As amostras sanguíneas foram recolhidas de 119 animais, pertencentes a 12 explorações dedicadas à produção de leite, de diferentes zonas da ilha. A prevalência total de animais infectados foi de 87,4% (104/119). As espécies *T. annulata* e *T. buffeli* estavam presentes em todas as explorações, com valores de prevalência que variavam de 20% a 100% (valor igual ao presente estudo), sendo que as prevalências médias destas espécies, foram de 53,3% e 69,75%, respectivamente.

Durrani, Kamal & Khan (2006) avaliaram a ocorrência de *T. annulata* num grupo de 600 búfalos do distrito de Lahore, Índia, e detectaram uma prevalência de 17,8% (107/600) através de observação microscópica de esfregaços sanguíneos. Durrani *et al.* (2008) colheram amostras sanguíneas de 336 búfalos, do mesmo distrito, e estimaram a prevalência dos agentes causadores da Teileriose Tropical. Por observação ao M.O., detectaram uma prevalência de 39,9% (134/336), enquanto que pelo teste PCR, a prevalência foi de 53,3% (179/336). Estes dados revelam a elevada sensibilidade dos testes moleculares, como a PCR, quando comparada com a observação microscópica.

Renneker *et al.* (2009) calcularam as prevalências de infecção por *T. annulata*, em 230 bovinos da região Norte do Iraque, recorrendo à técnica de ELISA indirecto e detectaram a presença de 90,9% (209/230) animais positivos. Ao aplicarem a cELISA calcularam uma prevalência de 80,9% (186/230). Al-Barwary (2007), citado por Renneker *et al.* (2009), testaram os bovinos da mesma região (299 amostras) por observação microscópica de esfregaços sanguíneos e detectaram 56,9% animais positivos para *T. annulata*. Por sua vez, Al-Saeed (2009), citado por Renneker *et al.* (2009), utilizaram as mesmas amostras, mas o meio de diagnóstico foi a PCR e a prevalência foi de 68,6%. Assim, Renneker *et al.* (2009) concluíram que o cELISA é o teste mais adequado para a detecção de anticorpos contra o antígeno TaSP no soro dos bovinos.

A existência de um teste de diagnóstico fidedigno e específico é importante para a detecção de infecções subclínicas por *T. annulata* e de animais portadores, em regiões endémicas. Devido às elevadas perdas económicas que a Teileriose Tropical provoca nestas zonas, são necessários estudos epidemiológicos e a implementação de programas de controlo, como as vacinas atenuadas (Renneker *et al.*, 2009).

Na Turquia, Karagenç *et al.* (2005) estudaram 16 bovinos de raça Holstein-Frísia (com idades entre os três meses e os oito anos de idade), infectados por *T. annulata*. Por observação microscópica dos esfregaços sanguíneos, detectaram que os níveis de parasitemia variavam entre 2% e 35%. Após aplicação de Buparvaquona (Butalex®), todos os animais permaneciam com merozoítos, mas a parasitemia diminuía para níveis entre os 0,1% e 0,5%. Este estudo revela a importância deste fármaco, na redução dos níveis de infecção, em zonas endémicas.

Quanto à distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. nos vitelos (Gráfico 10), observou-se que se encontram mais uniformemente distribuídos pelos animais, do que nos adultos (Gráfico 5). Como se pode observar no gráfico 11, o nível I continua a prevalecer, com 38% (6/16) dos animais, seguido pelos níveis II e III com igual número de vitelos (5/16 em cada nível, o que corresponde a 31% dos animais). O facto de existirem mais vitelos infectados em nível III do que bovinos adultos, pode dever-se à maior susceptibilidade dos primeiros, face à infecção por *T. annulata*, referida por CFSPH (2009). Contudo, os vitelos estudados não apresentavam sinais clínicos, o que não está de acordo com CFSPH (2009), que refere que os animais adultos são, frequentemente, assintomáticos, enquanto que os animais mais jovens desenvolvem, normalmente, sintomatologia grave e as taxas de mortalidade são muito mais elevadas. É importante salientar que a amostra de vitelos é muito menos significativa e representativa (com apenas 23% dos vitelos, isto é, 16 de uma população de 70) do que a amostra de animais reprodutores (96/97 animais), o que pode ter influência nos resultados pois a proporção em que são representados é bastante diferente. Poderia esperar-se que a distribuição dos níveis de infecção de *Theileria* spp. por grupos etários, nos vitelos (Gráfico 13) demonstrasse essa maior susceptibilidade destes animais.

Contudo, o animal mais jovem (idade inferior ou igual a três meses de idade), pertencente ao grupo etário 1, apresentava nível de infecção I. Sendo mais novo, terá tido menos tempo de contacto com os ixodídeos. É possível que este animal tivesse sido infectado há pouco tempo e ainda estivesse no início da fase hemoproliferativa ou que a espécie infectante fosse *T. buffeli*/*T. orientalis*. Os dois vitelos do grupo etário 2 (animais $> 3 \leq 6$ meses) encontram-se infectados, por *Theileria* spp., em níveis I e III. Este nível de infecção superior pode dever-se ao facto dos vitelos serem mais susceptíveis a *T. annulata* do que os bovinos adultos. Os dois vitelos pertencentes ao grupo etário 3 (animais $> 6 \leq 9$ meses) estão infectados em níveis I e II, sugerindo que com o aumento da idade os níveis de infecção tornam-se mais baixos. Contudo, no grupo etário 4 (animais $> 9 \leq 12$ meses), de um total de 11 vitelos, apenas três apresentam nível de infecção I, quatro exibem nível de infecção II e os outros quatro encontram-se infectados em nível III. Este facto pode dever-se à pequena amostra, que não traduz de modo fidedigno o que se passa na população de vitelos.

Os animais com Teileriose Tropical aguda, reportados por Branco (2009), tinham idades iguais ou inferiores a quatro meses, enquanto os que surgiram, em Setembro de 2009 e em Maio de 2010, na exploração em estudo, tinham idades compreendidas entre os dois e os três meses, reflectindo a maior susceptibilidade dos vitelos com estas idades à espécie *T. annulata*. Branco (2010) observou esfregaços sanguíneos de sete dos vitelos com Teileriose Tropical aguda e detectou que as percentagens de merozoítos intra-eritrocitários variaram de 5-10% (em dois animais, um com 3 semanas, outro com 2 meses de idade), 10-25% (em três vitelos com as seguintes idades: 3 semanas, 1,6 meses e 2 meses) e 25-50% (em dois vitelos, com 3 e 4 meses de idade). Se se observar a relação existente entre os níveis de parasitémia e as idades, destes animais e dos incluídos no presente estudo, observamos que existem pontos em comum. Por exemplo, os vitelos, observados por Branco (2010), com idades inferiores a 3 meses de idade apresentavam percentagens de merozoítos intra-eritrocitários mais baixas, assim como o do grupo 1, incluído neste estudo, que estava infectado em nível I. Por sua vez, os vitelos de 3 e 4 meses de idade tinham 25-50% merozoítos no estudo de Branco (2010), sendo que estas idades correspondem ao grupo etário 2, neste estudo, cujos animais têm níveis de infecção I e III. Apesar, dos animais observados por Branco (2010) apresentarem sintomatologia grave, nem sempre estavam associados a níveis elevados de infecção.

Também teria sido interessante analisar se existiam alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, na medida em que podem ser ferramentas auxiliares no diagnóstico. Por exemplo, na infecção por *T. annulata* pode ocorrer hemoglobínúria e bilirrubinúria (Radostits *et al.*, 2000), pelo que também poderia ser importante terem sido avaliados estes parâmetros.

Em áreas onde as espécies *T. annulata* e *T. parva* coexistem o recurso ao hemograma ou análises bioquímicas reveste-se de maior importância, na medida em que existem

alterações em alguns parâmetros, conforme o agente. A anemia, acompanhada de bilirrubinemia, são dados laboratoriais significativos na Teileriose Tropical (Ramazan *et al.*, 2007; Saber *et al.*, 2008) ao contrário do que acontece na Febre da Costa Oriental, em que a panleucopénia e a trombocitopénia são as alterações mais importantes (Radostits *et al.*, 2000). Sandhu *et al.* (1998), citado por Saber *et al.* (2008), atribuíram o aumento da bilirrubina à destruição dos eritrócitos por eritrofagocitose (que ocorre no baço, linfonodos e outros órgãos reticuloendoteliais), enquanto Omer *et al.* (2003), citado por Saber *et al.* (2008), atribuíram essa alteração à disfunção hepática e anemia hemolítica. Hasanpour *et al.* (2008), no Irão, concluíram que a infecção por *T. annulata* provocou alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e electrocardiográficos num grupo de 20 búfalos adultos (1,5 a 5 anos de idade). Os valores de parasitemia variaram de 20 a 30%.

No que se refere à distribuição por níveis de infecção de *Anaplasma* spp., nos animais reprodutores estudados, pode afirmar-se que foi semelhante à observada para *Theileria* spp. (Gráfico 5), na medida em que a maioria dos animais se encontra em nível de infecção I (61%), seguida do nível II (30%) (Gráfico 7). Contudo, para este género já existem animais em nível de infecção III (9%). Richey (1992, citado por Antunes, 2008) afirmou que a maioria dos animais que recuperam da infecção ficam portadores assintomáticos, pois os níveis de parasitemia mantêm-se extremamente baixos. Esta informação não está completamente de acordo com o presente estudo, pois, embora 95 dos 96 animais se apresentem assintomáticos, 29 estão em nível de infecção II e 9 bovinos em nível III, ou seja 39,5% (38/96) dos animais apresentam mais de 10 merozoítos/10 campos ao M.O..

No que diz respeito à distribuição dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. por grupos etários, nos animais reprodutores (Gráfico 9), pode observar-se que o número de animais pertencentes ao nível de infecção I vai decrescendo à medida que as idades aumentam (se excluirmos o grupo etário 1 e 5, que têm reduzido número de animais). Quanto ao número de animais com infecção em nível II, parece ter tendência a decrescer com o aumento da idade (se excluirmos o grupo etário 1).

Quando os bovinos não são expostos a *Anaplasma* spp. durante o seu crescimento, a sua resistência diminui e os animais adultos tornam-se susceptíveis, na maioria dos casos. Desta forma, se estes animais estiverem em contacto com animais infectados e na presença de ixodídeos vectores, a probabilidade de ocorrência de Anaplasmosose é bastante elevada (HealthGene, 2008, citado por Antunes 2008).

Apesar dos animais de todas as idades serem susceptíveis à Anaplasmosose, os animais mais velhos, manifestam os sinais clínicos de forma mais exuberante. Assim sendo, os resultados referentes ao nível de infecção I estão em concordância com os trabalhos de Richey (1992), mas os que dizem respeito ao nível II, não o estão, pois se os animais mais velhos fossem

mais susceptíveis, o número de bovinos com níveis de infecção II e III, deveriam aumentar com a idade, o que não se verificou neste estudo.

Contudo, se os animais em estudo, estiveram permanentemente em contacto com os ixodídeos, vectores de *Anaplasma* spp., foram expostos ao agente, pelo que a sua resistência a ele, pode não ter diminuído com a idade, como foi referido por aquele autor. Por outro lado, segundo Richey (1992), cerca de 50% dos animais infectados por *Anaplasma* spp., depois dos três anos de idade, pode morrer. Os bovinos que recuperam, tornam-se, na sua maioria, portadores, com níveis sanguíneos baixos de *Anaplasma* spp. e, normalmente, são resistentes a reinfecções. Os resultados observados, no presente estudo, podem reflectir essa reduzida parasitémia, presente nos animais portadores assintomáticos. Convém, ainda, salientar que a distribuição do número de animais por grupos etários é muito heterogénea, influenciando a interpretação dos resultados. Por exemplo, em termos proporcionais, não é correcto afirmar-se que o grupo etário 2 é o que possui maior número de animais com nível de infecção III.

Será importante referir que, durante o decorrer da recolha de amostras, observou-se um animal (Figura 14) que chamou a atenção por se encontrar deprimido, emaciado e apresentar um marcado edema submandibular. Este animal também apresentava hipertrofia dos linfonodos submandibulares, mucosas ligeiramente anémicas e secreção lacrimal. Estes sinais podem estar presentes num animal infectado por *T. annulata*, pois os sinais clínicos de Teileriose são inespecíficos, podendo ser associados a qualquer outra doença (Navarrete *et al.*, 2002). O bovino em causa era do sexo feminino, nasceu no ano de 1998, pelo que foi incluído no grupo etário 3. Através da observação do esfregaço sanguíneo deste animal, pode observar-se a presença de formas parasitárias compatíveis com *Theileria* spp., em nível de infecção I e de *Anaplasma* spp. em nível de infecção II. Foi efectuada punção de um linfonodo mandibular e o material colhido foi colocado numa lâmina. Depois deste esfregaço ser corado pelo Giemsa, foi observado ao microscópio óptico, mas o resultado não foi conclusivo. No que diz respeito à infecção por *Theileria* spp., sabe-se que os merozoítos aparecem, na fase hemoproliferativa ou hemolítica, dois a três dias após o aparecimento dos esquizontes (que podem ser detectados nos linfonodos, 6 a 28 dias após a infecção) (Navarrete *et al.*, 2002). Como não foram detectados esquizontes no material obtido através da punção do linfonodo do animal em causa, era possível que já tivessem passado 28 dias desde o momento da inoculação dos esporozoítos pelo ixodídeo, pois se a colheita de sangue tivesse ocorrido no período da infecção que antecede o limite mínimo dos 6 dias, ainda não teriam sido observados merozoítos. Por outro lado, a fase hemolítica, que é exuberante do ponto de vista clínico, caracteriza-se pela replicação massiva dos merozoítos intra-eritrocitários (Navarrete *et al.*, 2002). Assim, faria sentido observar-se mais de 20 merozoítos por 10 campos de observação microscópica, pelo que este animal estaria em nível de infecção III, o que não é o caso. Desta forma, a hipótese de que os sinais

clínicos que o animal apresentava fossem consequência da infecção por *Theileria* spp. parece pouco provável.

Este animal apresentava infecção por *Anaplasma* spp. em nível II, pelo que os sinais clínicos como depressão e mucosas pálidas, podiam dever-se à anemia, resultante da lise dos eritrócitos. Estes sinais são coincidentes com os que se observam numa fase inicial de Anaplasmosse. A febre também faz parte deste quadro clínico, mas, neste caso, não foram efectuadas medições de temperatura corporal. Parece pouco provável que este animal se encontrasse numa fase mais avançada desta doença, pois não apresentava outros sinais, tais como obstipação alternada com diarreia, excitação e mucosas ictéricas, referidos pela OIE (2008). Segundo Richey (1992, citado por Antunes 2008), quando os animais recuperam da fase clínica, podem apresentar perda de peso (que se verificava neste caso) e episódios de aborto (dos quais não se teve conhecimento).

A. marginale é responsável pela maior parte dos casos de doença clínica, enquanto *A. centrale* é responsável por sintomas mais moderados ou por doença subclínica (OIE, 2008). Este animal poderia estar infectado por qualquer uma das espécies de *Anaplasma* ou por ambas, uma vez que não foi efectuado nenhum tipo de teste de diagnóstico que permitisse a identificação da espécie.

Contudo, os sinais clínicos que esta vaca apresentava também podem ser sugestivos de outras doenças, por exemplo o edema submandibular pode ser indicativo de Fasciolose. Assim sendo, embora pareça possível que os sinais apresentados sejam consequência da infecção mista por *Theileria* spp. e *Anaplasma* spp., deveriam ter sido realizados outros exames complementares de diagnóstico.

Em relação à proporção dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. nos vitelos (Gráfico 12) pode observar-se que metade dos animais (8/16) encontravam-se infectados em nível I, 44% (7/16) em nível II e apenas 6% (1/16) com um nível de infecção III, o que está de acordo com o facto de os vitelos, filhos de mães imunes contra *Anaplasma*, receberem anticorpos maternos, via colostro. Assim, fará sentido a existência de 50% dos vitelos com níveis baixos de parasitemia (nível I), pois se foram expostos à infecção no período em que a imunidade passiva ainda é importante, raramente exibem sinais clínicos (Richey 1992, citado por Antunes, 2008).

No que respeita à distribuição dos níveis de infecção de *Anaplasma* spp. por grupos etários, nos vitelos (Gráfico 14) pode afirmar-se que o animal do grupo etário 1 (com idade igual ou inferior a três meses de idade), se encontra infectado em nível I, o que é explicado pelo facto da imunidade passiva, transmitida de vacas que já contactaram com *Anaplasma* spp. para os vitelos, durar cerca de três meses (HealthGene, 2008, citado por Antunes 2008). Os dois animais que pertencem ao grupo etário 2 ($>3 \leq 6$ meses) apresentam nível de infecção I e o mesmo acontece com os do grupo etário 3 ($>6 \leq 9$ meses). Estes resultados expressam a “resistência etária natural” que permanece até aos 9/12 meses de idade, sendo que neste

período de vida do animal, é possível a coexistência de *Anaplasma* spp. e dos vectores, sem que os vitelos apresentem sintomatologia clínica (HealthGene, 2008, citado por Antunes 2008). Por outro lado, Richey (1992), citado por Antunes (2008), referiu que até aos seis meses de idade, os vitelos raramente manifestam sinais clínicos (o que pode ser explicado pelo nível de infecção I dos grupos etários 1 e 2).

Dos 11 animais pertencentes ao grupo etário 4 ($>9 \leq 12$ meses), três foram classificados com nível de infecção de I, sete animais com nível de infecção II e um animal com nível de infecção III. Os animais do grupo etário 4, infectados em nível I, provavelmente ainda expressam a resistência natural (que pode ir até aos 12 meses de idade). Os animais que pertencem aos níveis II e III demonstram que com o aumento da idade, a imunidade contra *Anaplasma* spp. vai diminuindo, e vão aparecendo maiores níveis de infecção. Dos seis meses aos três anos de idade, a susceptibilidade aumenta (o que explica o aumento dos níveis de infecção no grupo etário 4) e os animais afectados podem ficar gravemente doentes (Richey 1992, citado por Antunes, 2008). Contudo, os vitelos incluídos neste estudo não apresentavam sinais clínicos.

Com base nos dados obtidos neste trabalho, não foi possível efectuar associações estatísticas entre os grupos etários e os níveis de infecção, tanto para os animais reprodutores, como para os vitelos e ainda, entre ambos, o que não significa que estas não possam existir.

No que se refere aos ixodídeos, observou-se que 96,4% (108/112) dos bovinos estudados encontravam-se parasitados.

Na Tabela 10, observa-se que de um total de 92 espécimes recolhidos, 65% (60/92) eram *Hyalomma* spp. (Figuras 17 à 20) e 35% (32/92) eram *Rhipicephalus* spp. (Figuras 21 à 24). A forte infestação de ixodídeos observada e a predominância do género *Hyalomma* é explicada por alguns factores:

- O Ribatejo é uma região onde foram identificados ixodídeos do género *Hyalomma* (Caeiro, 1999);
- Os animais estavam em regime extensivo;
- Na época do ano em que a recolha de amostras foi efectuada (Verão), as elevadas temperaturas que se fazem sentir, naquela região, são propícias à existência e ao desenvolvimento de ixodídeos, principalmente, *Hyalomma* spp., consideradas “carraças de Verão” por Caeiro (1992);
- Os animais desta exploração não foram submetidos a banhos/pulverizações regulares com ectoparasiticidas;
- Em Junho de 2010, no momento da colheita das amostras sanguíneas e de ixodídeos para este estudo, os animais ainda não tinham sido submetidos à

desparasitação anual com Ivomec F® (Ivermectina + Clorsulon), por via subcutânea (a última tinha sido efectuada em Junho de 2009).

O facto dos animais se encontrarem em regime extensivo, em grandes áreas de campo, faz com que estejam em maior contacto com elevadas cargas de ixodídeos do que os que se encontram em pavilhões, onde a limpeza e desinfectação dos espaços é possível, minimizando a existência de ectoparasitas. Por outro lado, este tipo de sistema, expõe os animais ao clima da região, que é considerado sub-mediterrânico no Plano Director Municipal de Benavente (2007) e continental atenuado, por Medeiros (2000), citado por Madeira de Carvalho (2001). Este tipo de clima é propício para o desenvolvimento dos ixodídeos, que necessitam de temperaturas elevadas.

A maioria das fêmeas reprodutoras apresentava ixodídeos na zona do úbere, enquanto que nos vitelos, era a zona perianal a mais afectada. Este facto não está de acordo com Mehlhorn (2001), nem com OIE (2009) que referiram a orelha como um dos principais locais de fixação do ixodídeo vector. Contudo, não se pode afirmar que estes ectoparasitas estavam ausentes nos pavilhões auriculares dos bovinos incluídos neste estudo, uma vez que não foram pesquisados nessa zona, devido a contingências inerentes às condições e ao ritmo de trabalho.

Num estudo efectuado, na Turquia, por Ramazan (2007), em 46 bovinos de raça Holstein, naturalmente infectados por *T. annulata*, foram encontradas carraças engorgitadas em várias zonas do corpo de bovinos sintomáticos. Estas foram identificadas e pertenciam ao género *Hyalomma*. Os animais apresentavam uma elevada percentagem de parasitémia (64,85%). É importante salientar que a raça Holstein deriva da espécie *Bos taurus*, mais susceptível a *Theileria* spp.. Hasanpour *et al.* (2008), no Irão, também encontraram ixodídeos em várias zonas do corpo de animais infectados por *T. annulata*, sendo depois identificados como *Hyalomma* spp..

Como foi referido anteriormente, García-Sanmartín *et al.* (2006) estudaram a prevalência de *Theileria* spp., em bovinos da região Norte de Espanha, por RLB. A espécie *T. annulata* foi identificada em 8,4% (22/263) das amostras, enquanto *T. buffeli* foi a espécie mais prevalente, com 42,6% (112/263) das amostras positivas. Estes dados estão de acordo com a distribuição dos vectores de ambas as espécies, uma vez que o vector de *T. buffeli*, o ixodídeo *Haemaphysalis* spp., é comum no Norte de Espanha (Barandika *et al.*, 2006, citado por García-Sanmartín *et al.*, 2006), enquanto o vector de *T. annulata*, *Hyalomma* spp., é endémico nas regiões Sul e Este deste país, mas a sua presença é esporadicamente reportada na zona Norte (Estrada-Peña, 2004, citado por García-Sanmartín *et al.*, 2006). Contudo, o aparecimento recente de ixodídeos do género *Hyalomma* em bovinos de uma província do Norte de Espanha, leva a crer que a distribuição da Teileriose Mediterrânea possa estar a ser alterada, provavelmente devido às alterações climáticas dos últimos anos, como o aquecimento global, e modificações da vegetação característica de determinadas

áreas, podendo conduzir a um aumento e a uma alteração da distribuição da população de *Hyalomma* spp., e, consequentemente da Teileriose Mediterrânea (García-Sanmartín *et al.*, 2006).

Por outro lado, essas variações do clima podem possibilitar o aparecimento de ixodídeos de outros géneros, em áreas geográficas onde a sua ocorrência não está descrita, como é o caso dos vectores da *T. parva*, não identificada em Portugal, até à data.

O facto de, no presente trabalho, não terem sido identificados ixodídeos do género *Haemaphysalis*, vector de *T. buffeli*/*T. orientalis* (Navarrete *et al.*, 2002; García-Sanmartín *et al.*, 2006), não significa que não estejam presentes na exploração em estudo, uma vez que os espécimes identificados correspondem a uma pequena amostra dos ixodídeos existentes na exploração.

Desta forma, seria interessante um estudo mais aprofundado e um levantamento das espécies de ixodídeos existentes naquela região.

Após a discussão dos dados obtidos neste estudo, é de maior importância divulgar pela classe Médico-Veterinária e pelos produtores portugueses a existência da Teileriose Tropical. Ao compreenderem o impacto negativo desta doença e a forma de transmissão da mesma, os produtores estarão mais atentos à presença de ixodídeos nos bovinos e, assim, mais interessados em combatê-los.

O controlo dos vectores de *Theileria* spp. é muito importante e, em Portugal, ainda se reveste de maior importância, uma vez que foram retirados do mercado fármacos, cujos princípios activos eram de eleição no tratamento da Teileriose, como a buparvaquona. Várias razões podem estar subjacentes a este facto:

- Em Portugal, as exigências nos capítulos da qualidade, da eficácia e segurança dos medicamentos são cada vez maiores. Quando as empresas que os comercializam não possuem estudos que comprovem essas vertentes, também não os efectuam, devido ao elevado custo desses ensaios. Assim sendo, na maioria das vezes, em termos económicos, não é compensador investir nesses fármacos porque o retorno é praticamente nulo. E isto leva a que os medicamentos sejam retirados do mercado (São Braz, comunicação pessoal, Setembro 14, 2010);
- A parvaquona e a buparvaquona não conseguem destruir *Theileria* spp. por completo, ou seja, não conseguem erradicar a infecção, pelo que os animais permanecem portadores (Navarrete *et al.*, 2002; OIE, 2008);
- O preço elevado destes produtos torna-os inacessíveis para os pequenos produtores (Shkap *et al.*, 2010).

Apesar das desvantagens relacionadas com as resistências e com os problemas ambientais que os acaricidas podem causar, actualmente, são a única “arma”, à disposição dos produtores portugueses, para controlar a Teileriose bovina. Contudo, apesar da controvérsia, pode recorrer-se à aplicação de ectoparasiticidas eficazes contra ixodídeos, como aqueles cujos princípios activos são o amitraz, a cipermetrina e o diazinão.

O estudo efectuado por Alméria *et al.* (2009), revela a importância do controlo dos vectores da Teileriose bovina, nomeadamente, a Teileriose Mediterrânica. Aqueles autores concluíram que a utilização de ectoparasiticidas não tem influência sobre a prevalência de *T. buffeli*, mas, pelo contrário, têm um efeito muito significativo na diminuição da prevalência de *T. annulata* (de 90% para 47,5%, após aplicação). Quanto maior a frequência do controlo de ixodídeos, mais significativas eram as diminuições na prevalência de *T. annulata*.

Na maioria das zonas endémicas de Teileriose Tropical, predominam os pequenos produtores, que muitas vezes têm acesso limitado às medidas de controlo da doença. Por conseguinte, nas comunidades rurais pobres, esta doença é, não só uma causa importante de perdas de produção directas, mas também um obstáculo grave ao desenvolvimento económico (Morrison *et al.*, 2007).

Em áreas endémicas de Teileriose Tropical, com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, torna-se importante a criação de vacinas. Nesse sentido, é importante conhecer-se o polimorfismo fenotípico e genético de estirpes de *T. annulata*, mais propriamente, o conhecimento dos antígenos de superfície e do seu poder imunogénico (Branco, 2009).

6. Conclusão

Este estudo é um contributo para o conhecimento da ocorrência de *Theileria* spp. na região ribatejana, região endémica de Teileriose Mediterrânica, tendo como base uma exploração de bovinos de carne.

Dos 112 animais estudados, observou-se uma taxa de infecção de 100% para *Theileria* spp.. O nível de infecção I foi o mais frequente, tanto nos bovinos reprodutores (87,5%), como nos vitelos (37,5%). Foram observados mais vitelos infectados em nível II (31,3%), do que animais adultos (12,5%). Não foi observado nenhum bovino adulto com nível de infecção III, enquanto nos vitelos este nível teve igual expressão ao nível II. Os níveis de infecção mais elevados nos vitelos estão de acordo com a maior susceptibilidade destes animais a *Theileria* spp..

O género *Anaplasma* também foi identificado nos esfregaços sanguíneos da totalidade dos animais incluídos neste estudo, tendo, de igual modo, sido estabelecidos níveis de infecção. Contudo, o objectivo principal deste trabalho incidiu sobre a ocorrência de *Theileria* spp..

A recolha de uma amostra de ixodídeos revelou uma predominância de *Hyalomma* spp., reconhecido como vector de *Theileria annulata*. Foram, ainda, identificados ixodídeos do género *Rhipicephalus*, que também são importantes na transmissão de hemoparasitas.

É importante salientar que as medidas preventivas e de controlo de ixodídeos são, muitas vezes, negligenciadas.

Outro factor importante é o de não ser comercializado, em Portugal, o produto de eleição no combate à Teileriose, questão controversa, visto estarmos num país em que se pressupõe que muitos efectivos estejam infectados.

Em suma, os dados obtidos neste estudo realçam a importância da Teileriose bovina em Portugal. Para uma melhor compreensão do panorama da doença no país, seria importante realizar estudos subsequentes, versando o conhecimento da prevalência e epidemiologia de *Theileria* spp., em todo o território nacional. Só conhecendo a distribuição desta doença, se torna possível a implementação de meios de monitorização e de medidas de controlo eficazes.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, A., Ahmad, M. & Ahmad, R. (2007). Studies on the occurrence, clinical features and clinic pathological aspects of theileriosis in buffaloes. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 932-934.
- Ahmed, J.S. & Mehlhorn, H. (1999). The cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of Tropical Theileriosis. *Parasitology Research*, 85, 539-549.
- Ahmed, J.S., Glass, E.J., Salih, D.A. & Seitzer, U. (2008). Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity*, 14 (1), 5-12.
- Aktas, M., Dumanli, N. & Angin, M. (2004). Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *Hyalomma* species in the east of Turkey. *Veterinary Parasitology*, 119, 1-8.
- Almería, S., Delgado-Neira, Y., Adelantado, C., Huguet, M., Vinent, J. & Nicolàs, A. (2009). Mediterranean Theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): The effect of Tick Control on prevalence levels analysed by Reverse Line Blot (RLB) macroarrays. *Journal of Parasitology*, 95 (3), 598-603.
- Antunes, G.M. (2008) *Hemoparasitoses em bovinos de carne*. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Barnett, S.F. (1977). *Theileria*. In J.P. Kreier, *Parasitic Protozoa: Babesia, Theileria, Myxosporida, Microsporida, Bartonellaceae, Anaplasmatidae, Ehrlichia and Pneumocystis*. New York: Academic Press.
- Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Goyache, F., Royo, L.J., Conti, S., Lari, M., Martini, A., Magid, A., Ploumi, K., Boscato, P., Sineo, L. (2006). The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 8113-8118.
- Billiouw, M., Brand, J., Vercruysse, J., Speybroeck, N., Marcotty, T., Mulumba, M. & Berkvens D. (2005) Evaluation of the indirect fluorescent antibody test as a diagnostic tool for East Coast fever in eastern Zambia. *Veterinary Parasitology*, 127, 189–198.
- Branco, S.M.S. (2009). *Caracterização morfológica das lesões de tipo neoplásico em vitelos infectados por Theileria annulata*. Tese de Doutoramento em Medicina Veterinária. Évora: Universidade de Évora.
- Branco, S., Orvalho, J., Leitão, A., Pereira, I., Malta, M., Mariano, I., Carvalho, T., Baptista, R., Shiels, B.R., Peleteiro, M.C. (2010). Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *Journal of Veterinary Science*, 11(1), 27-34.
- Brígido, C., Fonseca, I.P., Parreira, R., Fazendeiro, I., Rosário, V.E. & Centeno-Lima, S. (2004). Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 123, 17-23.

- Brown, D.J., Campbell, J.D.M., Russel, G. C. Hopkins, J. & Glass, E.J. (1995). T cells activation by *Theileria annulata* infected macrophages correlates with cytokine production. *Clinical experimental immunology*, 102, 507-513.
- Caeiro, V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parassitologia*, 41, 11-15.
- Campbell, J.D.M., Brown, D.J., Nichani, A.K., Howie, S.E.M., Spooner, R.L. & Glass, E.J. (1997). A non-protective T helper 1 response against the intra-macrophage protozoan *Theileria annulata*. *Clinical & Experimental Immunology*, 108, 463-470. Acedido em Set. 13, 2010, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2249.1997.3861290.x/pdf>
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Theileriosis, 1-3 (2009) Acedido em Jun. 12, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/theileriosis_theileria_parva_and_theileria_annulata.pdf
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Rift Valley Fever, 1-4 (2007) Acedido em Jun. 30, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rift_valley_fever.pdf
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Bovine Babesiosis, 1-6 (2008) Acedido em Jun. 30, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Heartwater, 1-5 (2007) Acedido em Jul. 10, 2010, disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/heartwater.pdf>
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Contagious Bovine Pleuropneumonia, 1-5 (2008) Acedido em Jun. 30, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/contagious_bovine_pleuropneumonia.pdf
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Hemorrhagic Septicemia, 1-5 (2009) Acedido em Jul. 10, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/hemorrhagic_septicemia.pdf
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), Malignant Catarrhal Fever, 1-7 (2008) Acedido em Jul. 15, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/malignant_catarrhal_fever.pdf
- CFSPH - Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University (EUA), African Animal Trypanosomiasis, 1-5 (2009) Acedido em Jun. 30, 2010, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_african.pdf
- Cortez, P.P., Dias Pereira P., Cortez, A., Mendonça, C., Thompson, G. (2010). Três casos confirmados de febre Catarral maligna em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97 (541) 43-46.

- d'Oliveira, C., Weide, M., Habela, M.A., Jacquiet, P. & Jongejan F. (1995). Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2665-2669. Acedido em Jul. 1, 2010, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228552/pdf/332665.pdf>
- Direcção Geral de Veterinária (2008). Medicamentos de Uso Veterinário para hemoparasitoses em bovinos.
- Durrani, A.Z., Kamal, N. & Khan, M.S. (2006) Incidence of theileriosis and estimation of packed cell volume, total erythrocyte count and hemoglobin in buffaloes. *J. Anim. Pl. Sci*, 16 (3-4), 85-87.
- Durrani, A.Z., Ahmad, M., Ashraf, M., Khan, M.S., Khan J.A., Kamal, N. & Mumtaz, N. (2008). Prevalence of Theileriosis in Buffaloes and detection through blood smear examination and polymerase chain reaction test in district Lahore. *J. Anim. Pl. Sci*, 18(2-3), 1-3. Acedido em Jun. 15, 2010, disponível em: http://thejaps.org.pk/docs/18_2-3_2008/08-807.pdf
- El-Deeb, W.M. & Younis, E.E. (2009). Clinical and biochemical studies on *Theileria annulata* in Egyptian Buffaloes (*Bubalus Bubalis*) with particular emphasis on oxidative stress and ketosis relationship. *Cercetari Agronomice in Moldava*, 139 (3), 63-71.
- Fandamu, P. (2005). *Transmission and infection dynamics of Theileriosis in Southern Zambia: The effect of environmental and host factors*. Dissertation for the degree of Doctor (Ph.D.) in Veterinary Sciences. Belgium: Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology and Biometrics - Ghent University
- Fazendeiro, I. (2004). Chave dicotómica para identificação de ixodídeos. Apontamentos práticos de Parasitologia, FMV, UTL.
- Food and Agriculture Organization – FAO (2000). World Watch List for Domestic Animal Diversity. In FAO-United Nations Environmental Programme, Rome. Ed BD Scherf.
- García-Sanmartín, J., Nagore, D., García-Pérez, A. L., Juste, R. A. & Hurtado A. (2006). Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Veterinary Research*, 2 (16), 1-6.
- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongenjan, F. & Sparagano, O. (2001). Detection of hemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 99, 271–286.
- Glass, E.J., Craigmile, S.C., Springbett, A., Preston, P.M., Kirvar, E., Wilkie, G.M., Eckersall, P.D., Hall, R.F. & Brown, C.G.D. (2003). The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle tha is associated with pathology. *International Journal for Parasitology*, 33, 1409-1418.
- Glass, E.J., Preston, P.M., Springbett, A., Craigmile, S.C., Kirvar, E., Wilkie, G.M. & Brown, C.G.D. (2005). *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *International Journal for Parasitology*, 35, 337-347.
- Glass, E.J. & Jensen, K. (2007). Resistance and susceptibility to a protozoan parasite of cattle - gene expression differences in macrophages from different breeds of cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120, 20-30.
- Gomes, J., Santos-Gomes, G. & Botelho, A. (2010) Epidemiologia Molecular da Teileriose Bovina em Portugal. Congresso Português de Parasitologia, Porto. Set. 8 a 10, 2010.

- Graham, S.P., Brown D.J., Vatansever, Z., Waddington, D., Taylor, L.H., Nichani, A.K., Campbell, J.D., Adamson, R.E., Glass, E.J. & Spooner, R.L. (2001). Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause *in vivo*. *Vaccine*, 19, 2932-2944.
- Grewal, A., Ahuja, C.S., Singha, S.P.S. & Chaudhary, K.C. (2005). Status of Lipid Peroxidation, Some Antioxidant Enzymes and Erythrocytic Fragility of Crossbred Cattle Naturally Infected with *Theileria annulata*. *Veterinary Research Communications*, 29, 387-394.
- Gubbels, J.M., Vos, A.P., Weide, M.V., Viseras, J., Schouls, L.M., Vries, E., & Jongejan, F. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), 1782-1789.
- Hasanpour, A., Moghaddam, G.A. & Nematollahi, A. (2008). Biochemical, Hematological and Electrocardiographic changes in buffaloes naturally infected with *Theileria annulata*. *Korean Journal of Parasitology*, 46 (4), 223-227.
- Hashemi-Fesharki, R., Golchinfar, F., Madani, R. & Esmaeilnia, K. (2006). Comparative evaluation of antibody positive titer by ELISA and IFA in *Theileria annulata* vaccinated cattle in Iran. *Parasite*, 13, 71-74.
- Isogen Life Science (Taoufik, A., Nijhof, A., Hamidjaja, R., Jongejan, F., Pillay, V., Sonneveld M. & Boer, M.) (2004) Reverse line blot hybridization in the detection of tick-borne diseases. Acedido em Jul. 30, 2010, disponível em: <http://www.biotech-online.com/fileadmin/pdf/datasheet/reverse-line-blot-hybridisation-in-the-detection-of-tick-borne-diseases.pdf>
- Jensen, K., Makins, G.D., Kaliszewska, A., Hulme, M.J., Paxton, E., Glass, E.J. (2009). The protozoan parasite *Theileria annulata* alters the differentiation state of the infected macrophage and suppresses musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene (MAF) transcription factors. *International Journal for Parasitology*, 39, 1099-1108.
- Karagenç, T.I., Kiral, F.K., Seyrek, K., Bildik, A. & Eren, H. (2005). Detection of serum total sialic acid in cattle with natural tropical theileriosis. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156 (11), 578-582.
- Katzer, F., Ngugi, D., Schnier, C., Walker, A.R. & McKeever, D.J. (2007). Influence of host immunity on parasite diversity in *Theileria parva*. *Infection and Immunity*, 75 (10), 4909-4916.
- Kaya, G., Cakmak, A. & Karaer, Z. (2006). Seroprevalence of Theileriosis and Babesiosis of cattle. *Medycyna Weterynaryjna*, 62 (2), 156-158.
- Lizundia, R., Werling, D., Langsley, G. & Ralph, S.A. (2009). *Theileria* Apicoplast as a target for chemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 1213-1217.
- Madeira de Carvalho, L.M. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal*. Tese de Doutoramento em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

- Manuja, A., Nichani, A.K., Kumar, R., Sharma, R.D., Kumar B. (2001). Single dilution ELISAs using soluble piroplasm, cellular schizont and soluble schizont antigens for the detection of antibodies against *Theileria annulata*. *Veterinary Research*, 32,165-173. Acedido em Ago. 15, 2010, disponível em: http://www.vetres.org/index.php?option=com_article&access=doi&doi=10.1051/vetres:2001101&Itemid=129
- McKeever, D. J. (2007). Live immunisation against *Theileria parva*: containing or spreading the disease? *Trends in Parasitology*, 23 (12), 565-567.
- McKeever, D. J. (2009). Bovine immunity – a driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends in Parasitology*, 25 (6), 269-274.
- Mehlhorn, H. & Schein, E. (1984) The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology*, 23, 45-47. Acedido em Jun. 30, 2010, disponível em: http://www.google.com/books?hl=en&lr=&id=3xxdjjCvHicC&oi=fnd&pg=PA37&dq=The+piroplasms:+life+cycle+and+sexual+stages&ots=INMaIAxAdE&sig=1Bk9Yxj3ZU-oZMIKZoKmB_sTKSg#v=onepage&q=The%20piroplasms%3A%20life%20cycle%20and%20sexual%20stages&f=false
- Mehlhorn, H. (Ed.). (2001). Theileriosis. In H. Mehlhorn, *Encyclopedic reference of Parasitology: Diseases, Treatment, Therapy*. (2nd ed.). (pp. 564-568). Berlin: Springer.
- Mirzaei, M. (2007). Treatment of natural tropical theileriosis with the extract of the plant *Peganum harmala*. *Korean Journal of Parasitology*, 45 (4), 267-271.
- Morrison, I., McKeever, D., Dobbelaere, D., Tait, A., Sheils, B., Medley, G., Taracha, E., Darghouth, M., Glass, L., Langsley, G. & Karagenc, T. (2007). Wellcome Trust Project for Tropical Theileriosis. Acedido em Jun. 3, 2010, disponível em: <http://www.theileria.org/>
- Musoke, R.A., Twayongyere, R., Bizimenyera, E., Waiswa, C., Mugisha, A., Biryomumaisho, S. & McHardy, N. (2004). Treatment of East Coast Fever of Cattle with a Combination of Parvaquone and Frusemide. *Tropical Animal Health and Production*, 36 (3), 233-245.
- Navarrete, I., Serrano, F.J. & Reina, D. (2002). Theileriosis. In M.C. Campillo & F.A.R. Vázquez, *Parasitologia Veterinaria*. (3rd ed.). (pp. 294-302). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.
- Nazifi, S., Razavi, S.M., Hasanshahi, F. & Esmailnezhad, Z. (2009). Effect of the severity of *Theileria annulata* infection on some haematological parameters and antioxidant enzymes in naturally infected cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 12 (1), 63-69
- Nichani, A.K., Craigmile, S.C., Spooner, R.L., & Campbell, J.D.M. (1998). Diminished IL-2 responses and alteration of CD2 expression on CD8⁺ T cells are associated with a lack of cytotoxic T cells responses during *Theileria annulata* infection. *Clinical experimental immunology*, 116, 316-321
- Nijhof, A.M., Penzhorn, B.L., Lynen, G., Mollel, J.O., Morkel, P., Bekker, C.P. & Jongejan, F. (2003). *Babesia bicornis* sp. nov. and *Theileria bicornis* sp. nov.: Tick-borne parasites associated with mortality in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2249–2254.

- Office International des Épizooties (2008). OIE Terrestrial Manual Health Code 2008. Chapter 2.4.16, Theileriosis. Paris: OIE, disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.16_THEILIERIOSIS.pdf
- Office International des Épizooties (2008). OIE Terrestrial Manual Health Code 2008. Chapter 2.4.11, Enzootic Bovine Leukosis. Paris: OIE, disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.11_EBL.pdf
- Office International des Épizooties (2008). OIE Terrestrial Manual Health Code 2008. Chapter 2.4.1, Bovine Anaplasmosis. Paris: OIE, disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.01_BOVINE_ANAPLASMOSIS.pdf
- Office International des Épizooties (2009). OIE Technical Disease Card. Theileriosis. Paris: OIE, disponível em: <http://www.oie.int/eng/maladies/Technical%20disease%20cards/THEILIERIOSISFINAL.pdf>
- Oura, C.A. (2007). *Theileria parva* live vaccination: parasite transmission, persistence and heterologous challenge in the field. *Parasitology*, 134, 1205-1213
- Plano Director Municipal de Benavente (Revisão). Proposta de Plano Junho 2007. “Estudos de Caracterização do Território”, Vol.4 , Capítulos 4 e 9.
- Preston P.M., Brown, C.G., Bell-Sakyi, L., Richardson, W. & Sanderson, A. (1992). Tropical theileriosis in *Bos taurus* and *Bos taurus* cross *Bos indicus* calves: response to infection with graded doses of sporozoites of *Theileria annulata*. *Research in Veterinary Science*, 53, 230-243.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2000). Theileriosis. In O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood, K.W. Hinchcliff (Ed.). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (9th ed.). (pp.1324-1329). Edinburgh: W. B. Saunders Company Ltd.
- Rajput, Z.I., Hu, S.H., Arijo, A.G., Habib, M. & Khalid, M. (2005). Comparative study of Anaplasma parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *Journal of Zhejiang University*, 6B(11), 1057-1062. Acedido em Ago. 15, 2010, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1390651/pdf/JZUSB06-1057.pdf>
- Ramazan, C. & Ugur, U. (2006). Haematological and coagulation profiles during severe Tropical Theileriosis in cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 30, 577-582.
- Ramazan, C. & Ugur, U. (2007). Changes in selected serum components in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Bulletin Vet Inst Pulawy*, 51, 15-18. Acedido em Jul. 13, 2010, disponível em: http://bulletin.piwet.pulawy.pl/archive/51-1/03_898_Col.pdf
- Ravindran, R., Saravanan, B.C., Rao, J.R., Mishra, A.K., Bansal, G. C., Ray, D. (2007). A PCR-RFLP method for the simultaneous detection of *Babesia bigemina* and *Theileria annulata* infections in cattle. *Current Science*, 93 (12), 1840-1843.
- Renneker, S., Kullmann, B., Gerber, S., Dobschanski, J., Bakheit, M.A., Geysen, D., Shiels, B., Tait, A., Ahmed, J.S., Seitzer, U. (2008). Development of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Transboundary and emerging diseases*, 55, 249-256.

- Renneker, S., Abdo, J., Ahmed, J.S. & Seitzer, U. (2009) Field validation of a competitive ELISA for detection of *Theileria annulata* infection. *Parasitology Research*, 106, 47-53.
- Saber, A.P.R., Khorrami, M. & Nouri, M. (2008) Evaluation of haematochemical parameters in crossbred cattle naturally infected with *Theileria annulata* in Iran. *International Journal of Dairy Science*, 3 (4), 205-209.
- Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., Miyazaki, S. & Nakamura, I. (2003). The Influence of Oxidative Bursts of Phagocytes on Red Blood Cell Oxidation in Anemic Cattle Infected with *Theileria sergenti*. *Free Radical Research*, 37 (11), 1181-1189. Acedido em Jul. 15, 2010, disponível em: <http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=10&hid=110&sid=9df0f904-86f8-468e-87af-3b4743ca2884%40sessionmgr111>
- Shkap, V., Leibovich, B., Krigel, Y., Fish, L. & Orgad, U. (2010). Evaluation of the combined formulation of Parvaquone and Frusemid (Fruvexon) in the treatment of experimental Tropical Theileriosis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 8 (1), 73-76.
- Spooner, R.L., Innes, E.A., Glass E.J. & Brown, C.G.D. (1989). *Theileria annulata* and *T. parva* infect and transform different bovine mononuclear cells. *Immunology*, 66, 284-288.
- Stockham, S.L., Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., Schmidt, D.A., Scott, M.A., Robinson, T.W., Tyler, J.W., Johnson, G.C., Carson, C.A. & Cuddihee, P. (2000). Theileriosis in a Missouri Beef Herd Caused by *Theileria buffeli*: Case Report, Herd Investigation, Ultrastructure, Phylogenetic Analysis, and Experimental Transmission. *Veterinary Pathology*, 37, 11-21.